



**João Miguel Paitio Ferrão**

Licenciatura em Ciências da Engenharia Biomédica

**Aplicação da tecnologia de baixo custo  
*Lab-on-Paper* a biossensores colorimétricos  
não enzimáticos para a deteção de glucose**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia  
Biomédica

Orientador: Elvira Maria Correia Fortunato, Prof. Doutora, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Célia Maria Reis Henriques

Arguente: Prof. Doutor Paulo Cruz Paixão

Vogal: Prof. Doutora Elvira Maria Correia Fortunato



**João Miguel Paitio Ferrão**

Licenciatura em Ciências da Engenharia Biomédica

**Aplicação da tecnologia de baixo custo *Lab-on-Paper* a biossensores colorimétricos não enzimáticos para a deteção de glucose**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Elvira Maria Correia Fortunato, Prof. Doutora, FCT-UNL

Departamento de Física  
Faculdade de Ciências e Tecnologia  
Universidade Nova de Lisboa

**Setembro 2017**



# **Aplicação da tecnologia de baixo custo *Lab-on-Paper* a biossensores colorimétricos não enzimáticos para a deteção de glucose**

Copyright © 2017 – Todos os direitos reservados.

João Miguel Paitio Ferrão

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



Dedicado aos meus pais!

Muito obrigado por todo o carinho, força e apoio incondicional que sempre me deram.

*“Tudo parece impossível até que seja feito!”*

*Nélson Mandela*





## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, devo referir que é com uma enorme satisfação e realização pessoal que termino esta importantíssima etapa da minha vida e da minha formação académica. Este era um momento com o qual sonhava desde que entrei pela primeira vez na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL). Foi um percurso por vezes difícil, ao longo do qual muitos desafios foram superados, mas onde desistir nunca fez parte do dicionário. E o que hoje sinto é um orgulho enorme por tudo aquilo que consegui alcançar.

No entanto, tenho plena consciência de que jamais o teria conseguido fazer sozinho, até porque o sucesso do trabalho de investigação científica só é possível quando se tem o apoio de uma equipa completa, tecnicamente competente e focada num objetivo comum em prol do qual todos trabalham. Por isso mesmo, aqui deixo os meus mais sinceros agradecimentos a todas as pessoas que trabalham no CENIMAT (Centro de Investigação em Materiais) da FCT-UNL e que de alguma forma me ajudaram, contribuindo para que tudo isto fosse possível.

Agradeço em particular à minha orientadora, a Professora Elvira Fortunato, com quem tive o prazer e o privilégio de trabalhar, não só pela sugestão do tema para a minha dissertação e por me ter dado a oportunidade de integrar um centro de investigação de excelência mas também pela transmissão de conhecimentos, disponibilidade, capacidade de estímulo e acompanhamento ao longo de todo o trabalho.

Um obrigado muito especial também à Carolina Marques que desde o início deste trabalho me acompanhou, mostrando-se sempre disponível para me ajudar, para discutir pontos de vista, opinando e dando-me sugestões. Agradeço-lhe igualmente toda a paciência que demonstrou para me fazer entender as coisas.

Sendo o trabalho de investigação científica necessariamente um trabalho de equipa, gostaria também de agradecer a todo o grupo do CENIMAT não só pelo carinho e pela simpatia com que me receberam e sempre me trataram, mas também pelo apoio, pela disponibilidade e por todos os conselhos que me deram. Um agradecimento especial à Daniela Gomes pela ajuda na visualização e análise das amostras no SEM, à Sónia Pereira pelas análises de DRX, à Maria João Oliveira pelo auxílio na observação das amostras no Raman, ao Rodrigo Santos pelo apoio na utilização do Ângulo de Contacto, à Alexandra Gonçalves e à Ana Pimentel pela ajuda nas análises de DSC que realizei e ao Bruno Veigas pelo auxílio na otimização dos resultados referentes à análise RGB dos sensores.

Uma palavra de apreço e de reconhecimento também a algumas pessoas e entidades exteriores ao CENIMAT pela colaboração em partes essenciais deste trabalho e que em muito contribuíram para o seu enriquecimento e valorização, nomeadamente ao Professor Paulo Ferreira do INL (*International Iberian Nanotechnology Laboratory*), em Braga, e ao Professor Pedro Da Costa da KAUST (*King Abdullah University of Science & Technology*), na Arábia Saudita, pela visualização e análise das amostras no TEM.

Quero agradecer também às minhas colegas de laboratório, Ana Samouco e Mónica Machado, e a todos os amigos que fiz no CENIMAT pelas conversas, pelos momentos divertidos e de descontração, pela ajuda e companhia e por tudo aquilo que vivemos juntos.

E porque o melhor fica sempre para o fim, não poderia terminar sem antes agradecer do fundo do coração à minha família e em particular aos meus pais, pois é também muito graças a eles que estou a terminar esta etapa da minha vida com sucesso. Muito obrigado pelo amor, pela educação e valores que sempre me transmitiram e pelo esforço que fizeram para permitir que eu continuasse os meus estudos. E porque apesar da distância sempre estiveram presentes na minha vida ao longo destes 5 anos apoiando-me, aconselhando-me e dando-me força para nunca desistir. Espero que tenham tanto orgulho em mim como eu tenho em vocês.

Por último, quero agradecer aos meus amigos e em especial à minha namorada por todo o apoio e disponibilidade, pelos desabafos, conselhos e carinhos e por toda a paciência que sempre teve para me ouvir.

Muito obrigado a todos vocês por me terem ajudado a terminar esta etapa com sucesso e da melhor maneira possível!



## RESUMO

Segundo dados divulgados pela Organização Mundial de Saúde, a diabetes é uma das doenças com maior prevalência, afetando atualmente mais de 400 milhões de pessoas em todo o Mundo, sendo previsível que estes números continuem a aumentar. Para além disso, esta doença é responsável por milhões de mortes anuais, a maioria das quais em países subdesenvolvidos ou em regiões remotas onde o acesso a infraestruturas médicas e hospitalares é limitado, o que impõe a necessidade de existência de dispositivos para deteção de glucose precisos e economicamente acessíveis.

Face às suas propriedades, o papel representa uma alternativa na realização de testes *point-of-care* para determinação colorimétrica dos níveis de glucose, permitindo efetuar diagnósticos simples, rápidos e económicos. Contudo, todos os dispositivos existentes atualmente funcionam à base de enzimas, o que não só aumenta o seu custo como também afeta o seu prazo de validade e consequente funcionamento.

O principal objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de um biossensor colorimétrico não enzimático em papel para deteção de glucose. A construção dos sensores foi efetuada recorrendo à tecnologia *Lab-on-Paper*, que consiste na definição de zonas de teste hidrofílicas no papel, delimitadas por regiões hidrofóbicas formadas pela impressão e difusão de uma camada de cera. Quanto ao seu princípio de funcionamento, este baseia-se na síntese de nanopartículas de ouro por redução de um sal de ouro em que a glucose constitui o próprio agente redutor. Diferentes concentrações de glucose resultam na formação de nanopartículas com diferentes tamanhos, às quais estão associadas alterações de cor do sensor.

Os sensores desenvolvidos foram testados e calibrados utilizando diferentes concentrações de glucose entre 0 e 50 mM. Os resultados obtidos foram analisados visualmente e digitalmente através do *software* de análise de imagem *ImageJ*, tendo o sensor colorimétrico revelado sensibilidade na determinação dos níveis de glucose em amostras, de uma forma simples, rápida e económica. Foram ainda comparados os resultados colorimétricos obtidos com um digitalizador e com uma câmara de *smartphone*, concluindo-se que ambos os métodos constituem alternativas viáveis na análise digital dos sensores.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biossensores de papel; testes de diagnóstico rápido; glucose; dispositivos não enzimáticos; nanopartículas de ouro; deteção colorimétrica.



## ABSTRACT

According to data released by the World Health Organization, diabetes is one of the most prevalent diseases, currently affecting more than 400 million people worldwide and these numbers are expected to continue increasing. In addition, this disease accounts for millions of deaths each year, many of whom are in developing countries or remote regions where access to medical and hospital infrastructures is limited, which imposes the need for accurate and economically accessible glucose detection devices.

Due to its properties, paper represents an alternative in the performance of point-of-care tests for colorimetric determination of glucose levels, allowing simple, rapid and inexpensive means of diagnosis. However, all existing devices now are enzyme-based, which not only increases their cost but also affects their shelf life and consequently their operation conditions.

The main goal of this work was the development of a colorimetric, enzyme-free paper-based biosensor for glucose detection. The sensors construction was performed using *Lab-on-Paper* technology, which consists of the definition of hydrophilic test zones on paper, delimited by hydrophobic regions formed by printing and diffusing of a wax layer. Regarding the sensor operating mode, it is based on the synthesis of gold nanoparticles by reducing of a gold salt in which glucose is the reducing agent. Different concentrations of glucose result in the formation of nanoparticles of different size, to which color changes of the sensor are associated.

The developed sensors were tested and calibrated using different concentrations of glucose from 0 to 50 mM. The obtained results were visually examined and digitally analyzed through the image analysis software *ImageJ*. The colorimetric sensor revealed sensitivity to determination of glucose levels in samples, in a simple, rapid and inexpensive way. It was also compared the colorimetric results obtained with a scanner and with a smartphone camera, concluding that both methods are viable alternatives in the digital analysis of the sensors.

**KEYWORDS:** Paper-based biosensors; point-of-care tests; glucose; enzyme-free devices; gold nanoparticles; colorimetric detection.



## LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SIGLAS

**AB** – Ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfônico

**Abs** – Absorvância

**a.C.** – Antes de Cristo

**ALP** – Fosfatase Alcalina (do inglês, *Alkaline Phosphatase*)

**ALT** – Alanina Transaminase (do inglês, *Alanine Transaminase*)

**AST** – Aspartato Transaminase (do inglês, *Aspartate Transaminase*)

**ARM** – Medidor de Refletância de Ames (do inglês, *Ames Reflectance Meter*)

**ASSURED** – Economicamente acessíveis, Sensíveis, Específicos, De fácil utilização, Rápidos e robustos, Independentes da utilização de equipamentos e Acessíveis a quem deles necessita (do inglês, *Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free and Delivered to those in need*)

**ATR** – Refletância Total Atenuada (do inglês, *Attenuated Total Reflectance*)

**AuNPs** – Nanopartículas de Ouro (do inglês, *Gold Nanoparticles*)

**BSA** – Albumina de Soro Bovino (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)

**CENIMAT** – Centro de Investigação em Materiais

**CGMs** – Sensores de Monitorização Contínua de Glucose (do inglês, *Continuous Glucose Monitors*)

**CRT** – Tubo de Raios Catódico (do inglês, *Cathode Ray Tube*)

**d.C.** – Depois de Cristo

**DLS** – Dispersão Dinâmica da Luz (do inglês, *Dynamic Light Scattering*)

**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)

**DRX** – Difração de Raios-X

**DSC** – Calorimetria Diferencial de Varrimento (do inglês, *Differential Scanning Calorimetry*)

**DTA** – Análise Térmica Diferencial (do inglês, *Differential Thermal Analysis*)

**EDS** – Espectroscopia Dispersiva de raios-X (do inglês, *Energy Dispersive Spectroscopy*)

**EF** – Fator de Intensificação (do inglês, *Enhancement Factor*)

**ELISA** – Ensaio Imunoenzimático (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

**EUA** – Estados Unidos da América

**FCT** – Faculdade de Ciências e Tecnologia

**FDA** – do inglês, *Food and Drug Administration*

**FTIR** – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

**FWHM** – Largura a Meia Altura (do inglês, *Full Width at Half Maximum*)

**HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*)

**HSM** – Monocromador de Alta Velocidade (do inglês, *High-Speed Monochromator*)

**INL** – Laboratório Ibérico Internacional de Nanotecnologia (do inglês, *International Iberian Nanotechnology Laboratory*)

**IUPAC** – União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

**KAUST** – Universidade de Ciência e Tecnologia Rei Abdullah (do inglês, *King Abdullah University of Science & Technology*)

**LFAs** – Ensaios de Fluxo Lateral (do inglês, *Lateral Flow Assays*)

**NPs** – Nanopartículas (do inglês, *Nanoparticles*)

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**OND** – Observatório Nacional da Diabetes

**POC** – do inglês, *Point-Of-Care*

**RGB** – Vermelho, Verde e Azul (do inglês, *Red Green Blue*)

**R6G** – Rodamina 6G

**SEM** – Microscopia Eletrônica de Varrimento (do inglês, *Scanning Electron Microscopy*)

**SERS** – Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície (do inglês, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*)

**SNS** – Serviço Nacional de Saúde

**SPR** – Ressonância Plasmônica de Superfície (do inglês, *Surface Plasmon Resonance*)

**TA** – Análise Térmica (do inglês, *Thermal Analysis*)

**TEM** – Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês, *Transmission Electron Microscopy*)

**TG** – Termogravimetria (do inglês, *Thermogravimetry*)

**TMA** – Análise Termomecânica (do inglês, *Thermomechanical Analysis*)

**u. a.** – Unidades adimensionais

**UNL** – Universidade Nova de Lisboa

**UV-Vis** – Ultravioleta-Visível

**μPADs** – Dispositivos de Análise de Microfluídica em Papel (do inglês, *Microfluidic Paper-based Analysis Devices*)



## LISTA DE SÍMBOLOS

$d$  – Distância entre planos cristalinos

$E$  – Energia

$I_{\alpha}$  – Estrutura cristalina triclinica da celulose tipo I

$I_{\beta}$  – Estrutura cristalina monoclinica da celulose tipo I

$I_c$  – Índice de cristalinidade

$I_{(002)}$  – Intensidade máxima do plano (002) da estrutura cristalina da celulose tipo I

$I_{(am)}$  – Intensidade de difração da componente amorfa de um dado material

$I_{Raman}$  – Intensidade Raman de uma determinada banda espectral

$I_{SERS}$  – Intensidade SERS de uma determinada banda espectral

$N_{Raman}$  – Número estimado de moléculas que contribuem para o sinal Raman

$N_{SERS}$  – Número estimado de moléculas que contribuem para o sinal SERS

$Z$  – Número atómico

$\lambda$  – Comprimento de onda

$\rho$  – Densidade

$\theta$  – Ângulo de Bragg

$\theta_c$  – Ângulo de contacto

$\gamma_{SG}$  – Tensão superficial da interface sólido-gás

$\gamma_{SL}$  – Tensão superficial da interface sólido-líquido

$\gamma_{LG}$  – Tensão superficial da interface líquido-gás



# ÍNDICE DE MATÉRIAS

AGRADECIMENTOS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SIGLAS.....	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xv
ÍNDICE DE MATÉRIAS.....	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xxi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xxvii
<b>1. ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>3</b>
2.1. Papel.....	3
2.1.1. Composição química do papel.....	4
2.1.2. Caracterização de diferentes tipos de papel.....	6
2.2. Biossensores.....	7
2.2.1. Biossensores em papel.....	8
2.2.1.1. Ensaio de fluxo lateral (LFAs).....	9
2.2.1.2. Dispositivos de análise de microfluídica em papel ( $\mu$ PADs) em formato 3D.....	10
2.2.2. Tecnologia <i>Lab-on-Paper</i> .....	11
2.3. (Bio)Nanotecnologia.....	12
2.3.1. Nanopartículas metálicas.....	13
2.3.2. Nanopartículas de ouro (AuNPs).....	14
2.4. Glucose.....	15
2.4.1. Diabetes.....	15
2.4.2. Estado da arte na deteção de glucose.....	17
2.4.2.1. <i>Lab-on-Paper</i> : deteção de glucose.....	19
<b>3. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.....</b>	<b>21</b>
3.1. Espectrofotometria de UV-Vis.....	21
3.2. Microscopia Eletrónica de Varrimento e de Transmissão.....	22
3.2.1. Espectroscopia Dispersiva de Raios-X.....	23
3.3. Difração de Raios-X.....	24
3.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....	25
3.5. Dispersão Dinâmica da Luz.....	26

3.6. Espectroscopia Raman.....	27
3.7. Análise Térmica.....	28
3.7.1. Termogravimetria.....	29
3.7.2. Calorimetria Diferencial de Varrimento.....	29
3.8. Ângulo de Contacto.....	29
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
4.1. Síntese de AuNPs em solução por redução com a glucose.....	31
4.2. Testes colorimétricos em solução para medição de diferentes concentrações de glucose.....	32
4.2.1. Espectrofotometria de UV-Vis.....	32
4.2.2. Influência de alguns interferentes da glucose.....	32
4.2.3. Reagente de Benedict.....	33
4.3. Caracterização das AuNPs sintetizadas em solução.....	34
4.4. Caracterização de diferentes tipos de substratos de papel.....	34
4.5. Construção dos sensores de papel para detecção de glucose.....	35
4.6. Síntese de AuNPs em papel por redução com a glucose.....	36
4.6.1. Espectrofotometria de UV-Vis.....	37
4.6.2. Análise Digital.....	38
4.7. Caracterização das AuNPs sintetizadas em papel.....	38
4.8. Fabricação do dispositivo final.....	38
4.8.1. Análise Digital.....	39
<b>5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
5.1. Síntese de AuNPs em solução por redução com a glucose.....	41
5.1.1. Espectrofotometria de UV-Vis.....	42
5.1.2. Influência de alguns interferentes da glucose.....	45
5.1.3. Reagente de Benedict.....	46
5.2. Caracterização das AuNPs sintetizadas em solução.....	48
5.2.1. Microscopia Eletrónica de Transmissão.....	48
5.2.2. Dispersão Dinâmica da Luz.....	53
5.3. Caracterização de diferentes tipos de substratos de papel.....	54
5.3.1. Microscopia Eletrónica de Varrimento.....	54
5.3.1.1. Espectroscopia Dispersiva de Raios-X.....	56
5.3.2. Difração de Raios-X.....	58
5.3.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....	60
5.3.4. Espectroscopia Raman.....	61
5.3.5. Ângulo de Contacto.....	62
5.3.6. Análise Térmica.....	63

5.4. Construção dos sensores de papel para detecção de glucose.....	64
5.4.1. Escolha do substrato.....	64
5.4.2. Formação das barreiras de cera hidrofóbicas.....	65
5.5. Síntese de AuNPs em papel por redução com a glucose.....	66
5.5.1. Espectrofotometria de UV-Vis.....	68
5.5.2. Análise Digital.....	69
5.6. Caracterização das AuNPs sintetizadas em papel.....	71
5.6.1. Microscopia Eletrônica de Varrimento.....	71
5.6.2. Espectroscopia Dispersiva de Raios-X.....	72
5.6.3. Difração de Raios-X.....	74
5.6.4. Espectroscopia Raman.....	75
5.7. Fabricação do dispositivo final.....	78
5.7.1. Análise Digital.....	79
5.7.2. Análise de Custos.....	80
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS DE TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>81</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>93</b>
<b>I – Comparação entre a posição do pico da banda SPR e o tempo de formação das AuNPs em solução para diferentes concentrações de glucose.....</b>	<b>93</b>
<b>II – Diâmetros médios das AuNPs sintetizadas em solução para diferentes concentrações de glucose, obtidos por DLS.....</b>	<b>94</b>
<b>III – Análise RGB para otimização das concentrações dos reagentes usados no processo de síntese de AuNPs em papel, utilizando microplacas de 24 poços em papel Whatman nº1.....</b>	<b>95</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1:</b> Representação estrutural das fibras de celulose.....	5
<b>Figura 2.2:</b> Diferentes tipos de biossensores em papel existentes: <b>(A)</b> Tiras de teste ( <i>dipstick</i> ); <b>(B)</b> LFAs; <b>(C)</b> $\mu$ PADs em formato 3D.....	9
<b>Figura 2.3:</b> Arquitetura de um ensaio de fluxo lateral.....	10
<b>Figura 2.4:</b> Exemplo de um dispositivo de microfluídica em papel em formato 3D para análise de múltiplos analitos.....	11
<b>Figura 2.5:</b> Esquema da sequência de etapas envolvidas no fabrico de dispositivos <i>Lab-on-Paper</i> .....	12
<b>Figura 2.6:</b> Formação da ressonância plasmônica de superfície (SPR).....	13
<b>Figura 2.7:</b> Soluções coloidais e respetivos espectros UV-Vis associados a AuNPs <b>(A)</b> antes e <b>(B)</b> após agregação das mesmas.....	15
<b>Figura 2.8:</b> Fórmula estrutural da glucose.....	15
<b>Figura 2.9:</b> Estimativa da prevalência da diabetes em adultos nas regiões da OMS.....	16
<b>Figura 2.10:</b> Tecnologias existentes e em desenvolvimento para deteção de glucose.....	17
<b>Figura 2.11:</b> Testes de monitorização não contínua dos níveis de glucose: <b>(A)</b> colorimétricos ( <i>urine dipstick</i> ); <b>(B)</b> eletroquímicos (medidor de glucose no sangue através de picada no dedo).....	18
<b>Figura 2.12:</b> <b>(A)</b> Constituição e <b>(B)</b> modo de funcionamento de um dispositivo CGM para monitorização dos níveis de glucose.....	18
<b>Figura 2.13:</b> Reações enzimáticas na base da determinação colorimétrica da concentração de glucose em amostras biológicas.....	20
<b>Figura 2.14:</b> Reação química de redução do ouro pela glucose, associada à síntese de AuNPs, para determinação colorimétrica da concentração de glucose em amostras através de um processo não enzimático.....	20
<b>Figura 3.1:</b> <b>(A)</b> Equipamento <i>TECAN SPARK 10M</i> , utilizado na caracterização por espectrofotometria de UV-Vis; <b>(B)</b> Representação esquemática do sistema ótico associado ao módulo de absorvância utilizado.....	22
<b>Figura 3.2:</b> <b>(A)</b> Representação esquemática de um equipamento de SEM; <b>(B)</b> Equipamento <i>Zeiss AURIGA CrossBeam SEM-FIB</i> , utilizado na caracterização por SEM.....	23
<b>Figura 3.3:</b> <b>(A)</b> Representação esquemática da difração do feixe incidente pelos planos cristalográficos do material; <b>(B)</b> Equipamento <i>X'Pert PRO MPD</i> da <i>PANalytical</i> , utilizado na caracterização por DRX.....	25
<b>Figura 3.4:</b> <b>(A)</b> Esquema representativo de um sistema ATR com múltiplas reflexões; <b>(B)</b> Equipamento <i>Nicolet 6700</i> da <i>Thermo Electron Corporation</i> , utilizado na caracterização por FTIR....	26

<b>Figura 3.5:</b> (A) Representação esquemática do fenómeno de Dispersão Dinâmica da Luz em duas amostras hipotéticas formadas por partículas com diferentes tamanhos; (B) Equipamento <i>AvidNano W130i SABRe optics</i> , utilizado na caracterização por DLS.....	26
<b>Figura 3.6:</b> (A) Diagrama de níveis de energia com indicação dos estados energéticos envolvidos nas dispersões de Rayleigh e de Raman; (B) Microscópio Raman da <i>Renishaw Qontor</i> , utilizado na caracterização por espectroscopia Raman.....	28
<b>Figura 3.7:</b> Equipamento <i>STA 449 F3 Jupiter</i> da <i>NETZSCH</i> , utilizado na análise térmica dos substratos de papel por TG e DSC.....	28
<b>Figura 3.8:</b> (A) Esquema representativo da relação entre o ângulo de contacto e as tensões superficiais das diferentes interfaces do sistema; (B) Equipamento <i>OCA 20</i> da <i>DataPhysics</i> , utilizado na medição do ângulo de contacto dos substratos de papel.....	30
<b>Figura 4.1:</b> Esquema do procedimento experimental relativo ao processo de síntese de AuNPs em solução por redução com a glucose.....	31
<b>Figura 4.2:</b> Esquema do procedimento experimental relativo ao estudo da influência dos interferentes da glucose no processo de síntese de AuNPs em solução.....	33
<b>Figura 4.3:</b> Microplacas de papel com: (A) 24 poços; (B) 96 poços; (C) 384 poços.....	35
<b>Figura 4.4:</b> Material utilizado para a impressão dos padrões de cera: (A) impressora de cera sólida <i>Xerox ColorQube 8570</i> ; (B) tinteiros de cera sólida <i>Xerox</i> .....	36
<b>Figura 4.5:</b> Placa térmica <i>SCHOTT ROBAX</i> , utilizada no processo de difusão dos padrões de cera no papel.....	36
<b>Figura 4.6:</b> Esquema do procedimento experimental relativo ao processo de síntese de AuNPs em papel por redução com a glucose.....	37
<b>Figura 4.7:</b> Representação esquemática das etapas de (A) impressão, (B) difusão da cera e (C) encapsulamento. Efeitos de cada etapa no confinamento do líquido no papel ((D), (E) e (F), respetivamente).....	39
<b>Figura 4.8:</b> Esquema representativo do processo de (A) aquisição de imagens dos sensores colorimétricos, utilizando uma câmara de <i>smartphone</i> e (B) leitura e análise das imagens obtidas através de algoritmos computacionais, para posterior quantificação dos resultados.....	39
<b>Figura 5.1:</b> Diferenças colorimétricas observadas em soluções contendo AuNPs sintetizadas por redução com a glucose, utilizando diferentes concentrações do agente redutor.....	42
<b>Figura 5.2:</b> (A) Espectros de absorvância normalizados das diferentes soluções de AuNPs e respetivo deslocamento da banda SPR; (B) Alterações no pico da banda SPR, registadas em função da concentração de glucose utilizada na síntese das AuNPs.....	43
<b>Figura 5.3:</b> Tempo de formação das AuNPs em solução, em função da concentração de glucose utilizada na síntese.....	44
<b>Figura 5.4:</b> Diferenças colorimétricas observadas em soluções de AuNPs sintetizadas por redução com diferentes concentrações de glucose e na presença de outras moléculas redutoras, de forma a estudar a sua influência na síntese.....	45



<b>Figura 5.5: (A)</b> Espetros de absorvância normalizados das diferentes soluções de AuNPs e respetivo deslocamento da banda SPR; <b>(B)</b> Alterações no pico da banda SPR, registadas em função da concentração de glucose utilizada na síntese das AuNPs.....	46
<b>Figura 5.6:</b> Diferenças colorimétricas observadas em soluções de glucose com diferentes concentrações, após reação com o reagente de Benedict.....	47
<b>Figura 5.7:</b> Espetros de absorvância não normalizados das diferentes soluções de glucose após reação com o reagente de Benedict.....	47
<b>Figura 5.8:</b> Imagens de TEM da amostra de AuNPs sintetizadas utilizando uma concentração de glucose de 1,25 mM.....	48
<b>Figura 5.9:</b> Espectro EDS da amostra de AuNPs sintetizadas utilizando uma concentração de glucose de 1,25 mM e identificação dos picos característicos.....	49
<b>Figura 5.10:</b> Imagens de TEM da amostra de AuNPs sintetizadas utilizando uma concentração de glucose de 10 mM.....	50
<b>Figura 5.11:</b> Espectro EDS da amostra de AuNPs sintetizadas utilizando uma concentração de glucose de 10 mM e identificação dos picos característicos.....	51
<b>Figura 5.12:</b> Imagens de TEM da amostra de AuNPs sintetizadas utilizando uma concentração de glucose de 50 mM.....	51
<b>Figura 5.13:</b> Espectro EDS da amostra de AuNPs sintetizadas utilizando uma concentração de glucose de 50 mM e identificação dos picos característicos.....	52
<b>Figura 5.14:</b> Variação do diâmetro médio das AuNPs em solução, em função da concentração de glucose utilizada no processo de síntese.....	53
<b>Figura 5.15:</b> Imagens de SEM do papel Whatman nº1 com uma ampliação de <b>(A)</b> 250x e <b>(B)</b> 1000x.....	54
<b>Figura 5.16:</b> Imagens de SEM do papel de fotocópia com uma ampliação de <b>(A)</b> 250x e <b>(B)</b> 1000x.....	55
<b>Figura 5.17:</b> Imagens de SEM do papel mata-borrão com uma ampliação de <b>(A)</b> 250x e <b>(B)</b> 1000x.....	55
<b>Figura 5.18:</b> Análise EDS dos substratos de papel utilizados: <b>(A)</b> Espetros cumulativos e identificação dos elementos químicos comuns a todos os tipos de papel; <b>(B)</b> Ampliação do espectro referente ao papel de fotocópia e identificação dos elementos químicos presentes apenas neste tipo de papel.....	56
<b>Figura 5.19:</b> Imagem de SEM e mapas de distribuição dos elementos detetados no papel Whatman nº1.....	57
<b>Figura 5.20:</b> Imagem de SEM e mapas de distribuição dos elementos detetados no papel mata-borrão.....	57

<b>Figura 5.21:</b> Imagem de SEM e mapas de distribuição dos elementos detetados no papel de fotocópia.....	58
<b>Figura 5.22:</b> Difrátogramas dos substratos de papel analisados e identificação das estruturas cristalinas neles presentes.....	59
<b>Figura 5.23:</b> Análise química dos substratos de papel considerados: <b>(A)</b> Espetros de FTIR-ATR e identificação das ligações químicas correspondentes aos picos característicos; <b>(B)</b> Estrutura química da celulose.....	60
<b>Figura 5.24:</b> Espetros Raman dos substratos de papel analisados e identificação dos constituintes do papel associados às bandas características.....	61
<b>Figura 5.25:</b> Ângulos de contacto referentes aos substratos de papel considerados: <b>(A)</b> Papel Whatman nº1, <b>(B)</b> Papel de fotocópia e <b>(C)</b> Papel mata-borrão.....	62
<b>Figura 5.26:</b> Análise térmica dos substratos de papel: <b>(A)</b> Papel Whatman nº1, <b>(B)</b> Papel de fotocópia e <b>(C)</b> Papel mata-borrão.....	63
<b>Figura 5.27:</b> Imagens de SEM de: <b>(A)</b> Cera impressa em papel Whatman; <b>(B)</b> Cera difundida em papel Whatman.....	65
<b>Figura 5.28:</b> Ângulo de contacto formado entre uma gota de água e o papel Whatman com a cera difundida.....	66
<b>Figura 5.29:</b> Síntese de AuNPs em papel por redução com a glucose, efetuada em microplacas de 96 poços, utilizando papel Whatman e papel de fotocópia.....	66
<b>Figura 5.30:</b> Síntese de AuNPs em papel por redução com a glucose, efetuada numa microplaca de 384 poços em papel Whatman.....	67
<b>Figura 5.31:</b> Síntese de AuNPs em papel por redução com a glucose, efetuada numa microplaca de 24 poços em papel Whatman.....	68
<b>Figura 5.32:</b> Espetros de absorvância correspondentes aos diferentes poços da microplaca de papel Whatman de 96 poços.....	69
<b>Figura 5.33:</b> Análise RGB dos resultados colorimétricos obtidos nas zonas de teste da microplaca de papel. Os resultados apresentados correspondem a uma concentração de $\text{HAuCl}_4$ de 0,01 M com quatro concentrações diferentes de NaOH.....	70
<b>Figura 5.34:</b> Retas de calibração do sensor de papel considerado: <b>(A)</b> reta sensível às baixas concentrações de glucose e <b>(B)</b> reta sensível às concentrações hiperglicémicas.....	71
<b>Figura 5.35:</b> Imagens de SEM das AuNPs sintetizadas em papel Whatman por redução com a glucose: <b>(A)</b> ampliação de 20 000x; <b>(B)</b> e <b>(C)</b> ampliação de 50 000x.....	72
<b>Figura 5.36:</b> Imagem de SEM e mapas de distribuição dos elementos detetados no papel Whatman com as AuNPs formadas.....	73
<b>Figura 5.37:</b> Espectro cumulativo referente à análise EDS do papel Whatman contendo as AuNPs sintetizadas.....	73

<b>Figura 5.38:</b> Comparação entre os difratogramas do papel Whatman com e sem as AuNPs formadas.....	74
<b>Figura 5.39:</b> Espectros Raman dos diferentes reagentes utilizados no processo de síntese das AuNPs.....	75
<b>Figura 5.40:</b> Comparação entre os espectros Raman do papel Whatman com e sem as AuNPs formadas.....	76
<b>Figura 5.41:</b> (A) Espectros Raman relativos à R6G no vidro utilizado como referência e à R6G no papel com as AuNPs; (B) Mapa de distribuição de moléculas de R6G em toda a área do poço no substrato de papel com as AuNPs.....	77
<b>Figura 5.42:</b> Protótipo do sensor colorimétrico não enzimático em papel desenvolvido: (A) Identificação das diferentes camadas que o constituem; (B) Sensor final e suas respectivas dimensões reais.....	78
<b>Figura 5.43:</b> (A) Ilustração dos resultados obtidos com o sensor de glucose encapsulado, utilizando uma concentração hipoglicêmica e outra hiperglicêmica; (B) Comparação entre a análise RGB dos resultados digitalizados com um digitalizador comercial e dos obtidos através de uma câmara de <i>smartphone</i> .....	79
<b>Figura 0.1:</b> Análise RGB dos resultados colorimétricos obtidos nas zonas de teste da microplaca de papel, correspondentes a uma concentração de $\text{HAuCl}_4$ de 0,01 M e a uma concentração de NaOH de 0,5 M.....	95
<b>Figura 0.2:</b> Análise RGB dos resultados colorimétricos obtidos nas zonas de teste da microplaca de papel, correspondentes a uma concentração de $\text{HAuCl}_4$ de 0,01 M e a uma concentração de NaOH de 1 M.....	95
<b>Figura 0.3:</b> Análise RGB dos resultados colorimétricos obtidos nas zonas de teste da microplaca de papel, correspondentes a uma concentração de $\text{HAuCl}_4$ de 0,01 M e a uma concentração de NaOH de 2 M.....	96
<b>Figura 0.4:</b> Análise RGB dos resultados colorimétricos obtidos nas zonas de teste da microplaca de papel, correspondentes a uma concentração de $\text{HAuCl}_4$ de 0,02 M e a uma concentração de NaOH de 0,5 M.....	96
<b>Figura 0.5:</b> Análise RGB dos resultados colorimétricos obtidos nas zonas de teste da microplaca de papel, correspondentes a uma concentração de $\text{HAuCl}_4$ de 0,02 M e a uma concentração de NaOH de 1 M.....	97
<b>Figura 0.6:</b> Análise RGB dos resultados colorimétricos obtidos nas zonas de teste da microplaca de papel, correspondentes a uma concentração de $\text{HAuCl}_4$ de 0,02 M e a uma concentração de NaOH de 2 M.....	97
<b>Figura 0.7:</b> Análise RGB dos resultados colorimétricos obtidos nas zonas de teste da microplaca de papel, correspondentes a uma concentração de $\text{HAuCl}_4$ de 0,01 M e a uma concentração de NaOH de 0,25 M.....	98



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> Principais constituintes da parede celular das células vegetais da madeira. Adaptado de Correia <sup>[2]</sup> .....	4
<b>Tabela 2.2:</b> Propriedades macroscópicas de diferentes tipos de papel. Adaptado de Costa <sup>[10]</sup> .....	6
<b>Tabela 2.3:</b> Comparação de diferentes dispositivos CGM comercializados atualmente. Adaptado de Wang e Lee <sup>[72]</sup> .....	19
<b>Tabela 5.1:</b> Custos de produção do sensor de papel desenvolvido para a detecção de glucose.....	80
<b>Tabela 0.1:</b> Comparação entre a posição do pico da banda SPR e o tempo de formação das AuNPs em solução para as diferentes concentrações de glucose testadas.....	93
<b>Tabela 0.2:</b> Valores médios e desvios-padrão do diâmetro das AuNPs formadas em solução, para as diferentes concentrações de glucose testadas.....	94



## Capítulo 1

### 1. ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS

O papel constitui indiscutivelmente um excelente meio de transporte para líquidos, tendo por isso mesmo começado a ser utilizado desde há muitas décadas como suporte para a movimentação de fluidos, possibilitando assim a separação e posterior análise dos seus constituintes. Para além disso, permite também efetuar filtrações em contexto laboratorial, propriedade que aliás tornou possível a sua otimização no que diz respeito à porosidade e pureza celulósica.

Ao longo dos últimos anos, o papel tem vindo a ganhar um destaque cada vez maior enquanto material de suporte para a realização de testes de natureza química e biológica. Este material apresenta de facto uma série de vantagens, nomeadamente a sua biocompatibilidade, fácil manuseamento, biodegradabilidade, facilidade de eliminação por incineração evitando contaminações, e por último, mas não menos importante, o seu baixo custo.

É de conhecimento geral que um dos aspetos mais preponderantes na prevenção e tratamento de doenças é a facilidade de acesso a meios de diagnóstico simples, fiáveis e eficazes, que permitam detetar essas doenças o mais cedo possível. No entanto, e embora estes meios de diagnóstico se encontrem normalmente disponíveis nos países mais desenvolvidos, é sobretudo nos países em desenvolvimento que a sua carência é maior. Como tal, a utilização do papel, essencialmente em testes *point-of-care* (POC), tem vindo a registar um crescimento considerável, constituindo atualmente um método alternativo de diagnóstico e de deteção, tanto de substâncias bioquímicas (ex: glucose ou ácido úrico) como de microrganismos patogénicos para o ser humano (ex: bactérias), proporcionando assim métodos de rastreio em regiões com dificuldades de acesso a infraestruturas médicas e hospitalares.

A diabetes é uma das doenças com maior prevalência em todo o Mundo, afetando atualmente mais de 400 milhões de pessoas. Para além disso, estima-se que todos os anos faleçam muitos milhares ou mesmo milhões de pessoas vítimas desta doença, quer de forma direta ou indireta, sobretudo nos países menos desenvolvidos. A diabetes é uma doença crónica que pode ocorrer em duas situações distintas: quando o pâncreas apresenta uma deficiência na produção de insulina (diabetes tipo I) ou quando o organismo não consegue utilizar de forma eficaz a insulina produzida (diabetes tipo II), sendo a segunda razão a responsável pela maior parte dos casos registados da doença.

A insulina é uma hormona que regula a concentração de glucose (açúcar) no sangue. Uma concentração demasiado baixa de glucose no sangue é designada por hipoglicemia, ao passo que uma concentração acima do normal se denomina hiperglicemia, esta última motivada por uma fase de descontrolo da doença que pode acarretar efeitos bastante graves para a saúde dos indivíduos.

O diagnóstico da diabetes é efetuado através de análises que determinam a concentração de glucose no sangue. Para além disso, nos pacientes com a doença os níveis de glucose têm que ser monitorizados regularmente.

É então neste sentido que surge a tecnologia *Lab-on-Paper*, cujo objetivo consiste essencialmente em aproveitar e potencializar as propriedades e as vantagens oferecidas pelo papel, aplicando-as no desenvolvimento de dispositivos que utilizem este material como substrato e que permitam determinar colorimetricamente a concentração de glucose em amostras, fornecendo testes POC que permitam efetuar um diagnóstico simples, rápido e económico, em alternativa aos suportes convencionais habitualmente utilizados na realização deste tipo de testes bioquímicos, os quais são formados a partir de plásticos, material prejudicial para o ambiente devido à grande lentidão do seu processo de degradação e à sua consequente permanência na natureza por muitos anos.

Os dispositivos existentes atualmente funcionam apenas com base em reações enzimáticas, cuja utilização irá inevitavelmente encarecer o sistema. Para além disso, a sensibilidade dessas enzimas a fatores ambientais como a temperatura ou o pH pode provocar a sua desnaturação, afetando assim o prazo de validade e consequentemente o funcionamento do biossensor. O que se pretende com este projeto é utilizar a tecnologia *Lab-on-Paper* na otimização desses dispositivos, através da construção de um protótipo de um biossensor colorimétrico não enzimático para determinação do nível de glucose, com a mesma facilidade de utilização mas apresentando um custo inferior e uma maior estabilidade.

O trabalho que se pretende realizar assenta portanto na seguinte sequência de objetivos:

1. Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro a serem utilizadas no processo de deteção colorimétrica de glucose, em alternativa aos suportes enzimáticos existentes;
2. Análise e caracterização de diferentes tipos de papel, do ponto de vista estrutural, químico e morfológico, com o recurso a várias técnicas de caracterização que serão apresentadas em capítulos posteriores desta dissertação;
3. Utilização da tecnologia *Lab-on-Paper* na produção de sensores em papel para posterior aplicação nos referidos testes para determinação do nível de glucose: escolha do suporte de papel, desenho do sensor e otimização das dimensões do mesmo para uma correta visualização da resposta colorimétrica pretendida;
4. Calibração dos sensores fabricados utilizando soluções aquosas com diferentes concentrações de glucose e comparação de diferentes métodos de aquisição dos resultados colorimétricos para posterior análise digital.

Este trabalho encontra-se na fronteira entre a Engenharia de Materiais, a Engenharia de Micro e Nanotecnologias e a Engenharia Biomédica, sendo um tema bastante atual a nível internacional. Para além disso, possui uma aplicação prática muito grande não só a nível laboratorial mas também em termos dos resultados que se esperam alcançar, sendo por isso expectável que o mesmo possa vir a constituir um importante contributo para o desenvolvimento da Engenharia Biomédica, nomeadamente ao nível da área da instrumentação biomédica em associação com a Medicina.



## Capítulo 2

### 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo são apresentados os fundamentos teóricos necessários para a compreensão do trabalho desenvolvido: utilização da tecnologia *Lab-on-Paper* na produção de um biossensor colorimétrico não enzimático para a deteção de glucose.

Em primeiro lugar, é feita uma abordagem à temática dos biossensores, com destaque para os biossensores em papel, fazendo-se referência a questões como a composição química do papel, bem como às propriedades que fazem deste um material de elevado interesse para o presente trabalho. É ainda efetuada uma comparação entre diferentes tipos de papel no que diz respeito às propriedades macroscópicas dos mesmos, assim como uma descrição da tecnologia associada à construção dos sensores em papel. Posteriormente é explorada a área da Bionanotecnologia, mais concretamente as nanopartículas de ouro que serão utilizadas na deteção colorimétrica de glucose. Para terminar, é apresentada a molécula de glucose e a patologia (crónica) a ela associada – a diabetes –, bem como uma síntese do estado da arte no que diz respeito aos tipos de biossensores existentes para deteção de glucose e ao tipo de matriz (sangue, urina ou saliva) por eles utilizada.

#### 2.1. Papel

O papel é um material de origem vegetal, fino, leve e flexível, obtido a partir de uma pasta aquosa de celulose, posteriormente seca e tratada quimicamente <sup>[1]</sup>. A invenção do processo de fabrico do papel é atribuída a Ts'ai Lun, ministro da agricultura do imperador Ho Ti's da China, que há cerca de dois mil anos atrás (105 d.C.) produziu com sucesso papel a partir de cascas, pedaços de bambu, redes de pesca e algodão, e mais tarde utilizando fibras vegetais. No entanto, o início da história do papel remonta a 2200 a.C. com a invenção do papiro pelos Egípcios, o qual era fabricado a partir de finas tiras da parte interna do caule da planta de papiro (*Cyperus papyrus*). O papiro era utilizado como meio de escrita na Antiguidade, sobretudo no Antigo Egipto, no Médio Oriente e na civilização greco-romana, sendo considerado o precursor do papel <sup>[2, 3]</sup>.

O papel é constituído por uma rede de fibras de celulose naturais, com um diâmetro médio de 20  $\mu\text{m}$ , unidas fisicamente por entrelaçamento das mesmas e quimicamente por pontes de hidrogénio, formando uma estrutura tridimensional <sup>[4]</sup>. Quimicamente, as fibras celulósicas são hidrofílicas, o que faz com que em contacto com soluções aquosas estas se espalhem na superfície e penetrem nos poros da estrutura fibrosa do papel. Uma maior resistência e carácter hidrofóbico são conseguidos através da introdução de aditivos químicos aquando do processo de produção do papel <sup>[5]</sup>.

Relativamente à sua utilização, o papel é normalmente associado à escrita, desenho, impressão, embalagens e utilitários (lenços de papel, papel higiénico, etc.), existindo no entanto outras aplicações deste material, como saquetas de chá, papel cirúrgico, dispositivos médicos e isolamento elétrico. É também comumente utilizado como suporte de filtração e cromatografia em laboratórios bioquímicos, e até mesmo na construção de componentes eletrónicos (ex: condensadores, transístores, etc.) <sup>[6]</sup>.

### 2.1.1. Composição química do papel

A composição química do papel depende não só da fonte de celulose que dá origem às fibras que constituem a sua rede, mas também do tratamento químico ao qual a madeira foi submetida para produzir a pasta de papel.

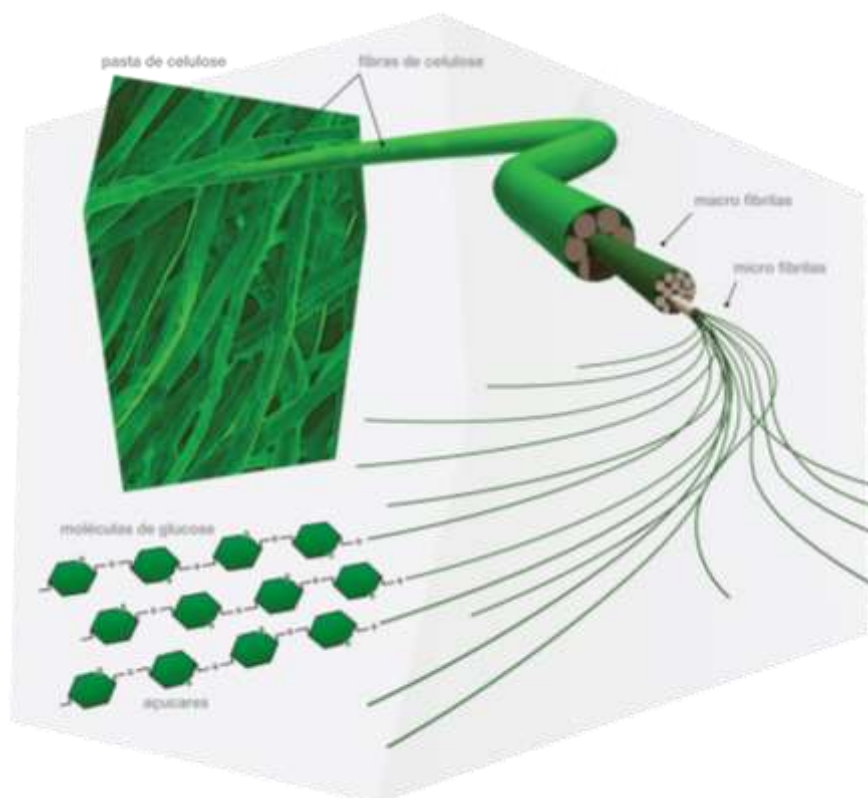
As paredes das células vegetais são formadas maioritariamente por celulose, hemicelulose e lenhina, contendo ainda uma pequena porção de extratos orgânicos e inorgânicos <sup>[7]</sup>.

A **Tabela 2.1** apresenta as percentagens dos principais constituintes da parede celular das células vegetais da madeira <sup>[2]</sup>.

**Tabela 2.1:** Principais constituintes da parede celular das células vegetais da madeira. Adaptado de Correia <sup>[2]</sup>.

Constituintes	Quantidade (%)
Celulose	~ 50
Hemicelulose	~ 20
Lenhina	~ 15 a 25
Outros constituintes	< 10

Tal como se pode constatar, a celulose é o elemento mais abundante na composição do papel, pelo que as propriedades físicas e mecânicas da folha de papel se devem às fibras celulósicas. A celulose de origem natural é um polissacarídeo linear homogéneo, organizado em microfibrilas e formado por monómeros de glucose ( $\beta$ -1,4-D-glucopirranose) ligados linearmente e covalentemente por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas (**Figura 2.1**). A celulose existente na pasta de papel tem normalmente cadeias compostas por 300 a 1700 unidades de glucose. Este biopolímero encontra-se presente na parede celular vegetal, assumindo funções estruturais importantes. Devido ao seu elevado grau de polimerização e cristalinidade, a celulose é responsável pela resistência das fibras. Quimicamente são as ligações por pontes de hidrogénio entre os grupos hidroxilo dos monómeros de glucose que proporcionam a interação entre as fibras celulósicas que constituem o papel, concedendo a resistência necessária para a sua formação <sup>[2, 5, 8]</sup>.



**Figura 2.1:** Representação estrutural das fibras de celulose <sup>[9]</sup>.

Os restantes componentes principais do papel são: a hemicelulose (heteropolímero formado por pentoses e hexoses que, ao contrário da celulose, possui uma estrutura amorfa com ligações fracas entre os seus monómeros e um baixo grau de polimerização, sendo responsável pela resistência à tração do papel) e a lenhina (polímero aromático hidrofóbico com uma estrutura extremamente complexa). A lenhina é normalmente removida no processo de fabrico do papel devido ao facto de ser fotossensível conferindo ao papel fragilidade e uma cor amarelada (ex: papel de jornal). <sup>[5]</sup>.

Para além dos processos químicos que tornam possível a remoção da lenhina e de outros compostos das fibras de celulose que vão formar o papel, existem também tratamentos que permitem alterar propriedades do papel, como o brilho ou o branqueamento. Todos estes processos interferem na composição química do papel, justificando assim a presença de resinas, minerais e outras substâncias na rede de papel <sup>[5]</sup>.

Para além da madeira, existem também outras plantas das quais podem ser extraídas fibras de celulose, como por exemplo o bagaço da cana-de-açúcar, o bambu, a juta, o cânhamo, o linho e o algodão. Todavia, quando comparadas com a celulose proveniente das árvores, estas fontes alternativas de celulose representam uma percentagem muito pequena do volume total de fibras usadas na produção de papel devido ao facto de possuírem um custo mais elevado <sup>[2, 5, 10]</sup>.

### 2.1.2. Caracterização de diferentes tipos de papel

O papel de cromatografia Whatman nº1 apresenta um número considerável de registos em aplicações de microfluídica e biossensores em papel [7, 11–13]. Contudo, as diferentes propriedades por ele apresentadas face a outros tipos de papel, sobretudo no que diz respeito à afinidade para os líquidos, fizeram com que mais recentemente tenham vindo a ser desenvolvidos estudos com outros tipos de papéis, como é o exemplo do papel de fotocópia.

No presente trabalho, utilizaram-se três tipos de papel (papel de cromatografia Whatman nº1, papel de fotocópia e papel mata-borrão), encontrando-se por isso sintetizadas na **Tabela 2.2** algumas das propriedades macroscópicas de cada um deles.

**Tabela 2.2:** Propriedades macroscópicas de diferentes tipos de papel. Adaptado de Costa [10].

Papel	Gramagem (g/m <sup>2</sup> )	Espessura (μm)	Densidade (kg/m <sup>3</sup> )	Porosidade (%)	Poros Médio (μm)
Whatman nº1	87	180	483,3	68,6	11
Fotocópia	80	104	769,2	50,0	–
Mata-borrão	279	488	571,7	62,9	–

A gramagem (massa de papel seco por metro quadrado) e a espessura são as duas propriedades macroscópicas básicas tipicamente utilizadas na caracterização deste tipo de material. Para além disso, a razão entre a gramagem e a espessura do papel permite-nos obter o valor da sua densidade.

No que diz respeito à porosidade do papel, esta encontra-se também relacionada com as propriedades mencionadas anteriormente, uma vez que resulta dos espaços entre as fibras, dos lúmens (canais centrais) das fibras que não colapsaram no processo de fabrico do papel e da porosidade intrínseca das paredes das fibras. Assim sendo, quanto maior for a densidade de um determinado papel menos espaços existem entre as suas fibras e consequentemente menor é a sua porosidade. É então possível fazer uma estimativa do volume total de poros relacionando a densidade das fibras de celulose ( $\rho_{fibra} = 1540 \text{ kg/m}^3$ ) com a densidade do papel, através da seguinte equação [14].

$$Porosidade (\%) = \left( 1 - \frac{\rho_{papel}}{\rho_{fibra}} \right) \times 100 \quad Eq. 2.1$$

Por outro lado, a densidade e a espessura do papel afetam as suas propriedades óticas como a opacidade e o brilho, que se revelam fundamentais na revelação de ensaios colorimétricos realizados em papel.

Comparando os três tipos de papel utilizados, é possível concluir que o papel mata-borrão é aquele que apresenta maior espessura embora não seja o mais denso. Em contrapartida, o papel de fotocópia é o mais denso dos três, sendo conseqüentemente o menos poroso. Já o papel Whatman possui uma espessura intermédia, sendo para além disso aquele que de entre todos apresenta uma menor densidade e conseqüentemente uma maior porosidade.

Relativamente à afinidade dos diferentes tipos de papel para materiais líquidos, um estudo efetuado por Jacob (2013) <sup>[14]</sup> concluiu que o papel Whatman tem um comportamento hidrofílico pois apresenta baixos ângulos de contacto, o que se traduz numa elevada capacidade de absorção. Pelo contrário, o papel de fotocópia possui elevados ângulos de contacto, sendo como tal hidrofóbico.

As diferenças verificadas entre os diferentes tipos de papel devem-se ao facto de durante o seu processo de fabrico serem utilizados diferentes aditivos consoante a finalidade do papel. Por exemplo, o papel de fotocópia tem na sua composição aditivos como o  $\text{CaCO}_3$  (carbonato de cálcio), enquanto o papel Whatman é constituído quase exclusivamente por fibras de celulose <sup>[15]</sup>.

### 2.2. Biossensores

Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), um biossensor é "um dispositivo integrado capaz de fornecer informação quantitativa ou semi-quantitativa específica, utilizando um elemento de reconhecimento biológico (recetor bioquímico), que é mantido em contacto direto com um elemento de transdução" <sup>[16]</sup>.

Um biossensor é portanto um dispositivo analítico que combina uma componente biológica (biorecetor) com um sistema de transformação de atividade num sinal mensurável (transdutor físico-químico), para deteção de um analito que pode ser biológico, como por exemplo vírus, bactérias, fungos ou até mesmo células cancerígenas <sup>[17–20]</sup>. Os biossensores podem ser classificados com base no tipo de biorecetor (interações anticorpo/antigénio, ácidos nucleicos, enzimas e células) ou transdutor (óticos, eletroquímicos, magnéticos, piezoelétricos e sensíveis às variações térmicas) <sup>[21, 22]</sup>.

São utilizados essencialmente para controlo nas áreas clínica e ambiental, tendo como principal objetivo o desenvolvimento de testes de diagnóstico rápido, *point-of-care*, com aplicações em áreas como a agricultura, saúde animal, ciências forenses, segurança alimentar e diagnóstico médico <sup>[23]</sup>.

Embora os testes POC sejam bastante comuns nos países desenvolvidos (ex: teste rápido de gravidez), a sua utilização é ainda mais fundamental nas regiões subdesenvolvidas, onde é evidente a escassez de acesso a infraestruturas médicas e hospitalares <sup>[11, 24]</sup>. Os biossensores surgem então como uma alternativa portátil, mais económica, de fácil manuseamento e com algumas características do diagnóstico molecular.

### 2.2.1. Biossensores em papel

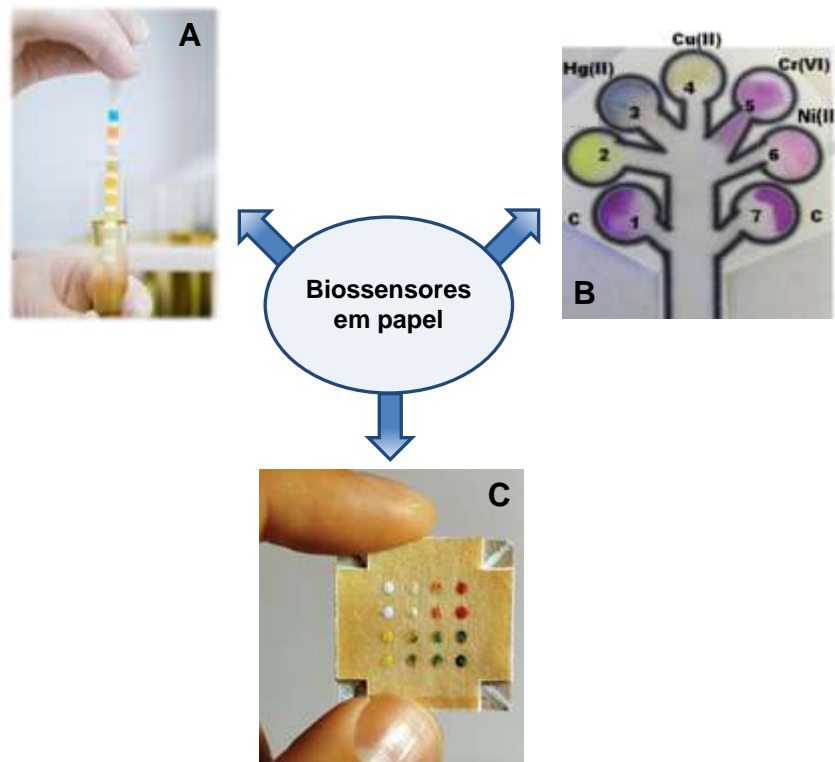
O papel constitui um ótimo suporte para a realização de testes colorimétricos, não só porque fornece um contraste forte devido à sua opacidade e cor branca, mas também por ser inflamável, o que facilita a eliminação dos testes por incineração <sup>[1]</sup>.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu uma série de sete diretrizes para o desenvolvimento de testes de diagnóstico para utilização em regiões economicamente desfavorecidas. O conjunto dessas normas corresponde ao acrónimo ASSURED (*Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free and Delivered to those in need*), o que significa que os testes devem ser: **i)** economicamente acessíveis, **ii)** sensíveis, **iii)** específicos, **iv)** de fácil utilização, **v)** rápidos e robustos, **vi)** independentes da utilização de equipamentos, e **vii)** acessíveis a quem deles necessita <sup>[25]</sup>.

A forte aproximação às características suprarreferidas faz com que a utilização do papel no desenvolvimento de sistemas analíticos adequados para aplicação em diagnósticos POC, seja cada vez mais uma aposta, nomeadamente através da combinação de plataformas baseadas em papel de baixo custo com a análise digital de imagens para identificação de analitos relevantes <sup>[26]</sup>. Este conceito faz uso de correlações colorimétricas quantitativas através de câmaras de telemóvel ou outros sistemas de captação de imagens para digitalizar resultados, permitindo assim a medição da intensidade da cor <sup>[27, 28]</sup>.

Os biossensores em papel podem ser divididos em três categorias:

- Tiras de teste (*dipstick*) (**Figura 2.2A**), baseadas na imersão na amostra de uma tira de papel com reagentes pré-depositados (ex: teste de análise de urina) <sup>[29]</sup>;
- Ensaio de fluxo lateral (LFAs – *Lateral Flow Assays*) (**Figura 2.2B**), em que os reagentes estão também armazenados, contudo a amostra depositada move-se facilmente por intermédio de forças de capilaridade do material através de um fluxo lateral num percurso predefinido na membrana porosa, permitindo o contacto de uma mesma amostra com vários reagentes em instantes diferentes <sup>[30, 31]</sup>;
- Dispositivos de análise de microfluídica em papel ( $\mu$ PADs – *Microfluidic Paper-based Analysis Devices*) (**Figura 2.2C**), que combinam as vantagens do papel com as da microfluídica, necessitando de um volume de amostra relativamente mais baixo em comparação com os dispositivos anteriores para obter análises múltiplas e semi-quantitativas. Os  $\mu$ PADs podem ser também construídos em formato 3D e utilizam normalmente um tipo de deteção colorimétrica devido ao facto dos resultados poderem ser observados a olho nu sem uso de equipamentos adicionais ou com o auxílio de um telemóvel ou de um digitalizador portátil para uma avaliação mais precisa <sup>[32–34]</sup>.



**Figura 2.2:** Diferentes tipos de biossensores em papel existentes: **(A)** Tiras de teste (*dipstick*); **(B)** LFAs; **(C)**  $\mu$ PADs em formato 3D.

#### 2.2.1.1. Ensaios de fluxo lateral (LFAs)

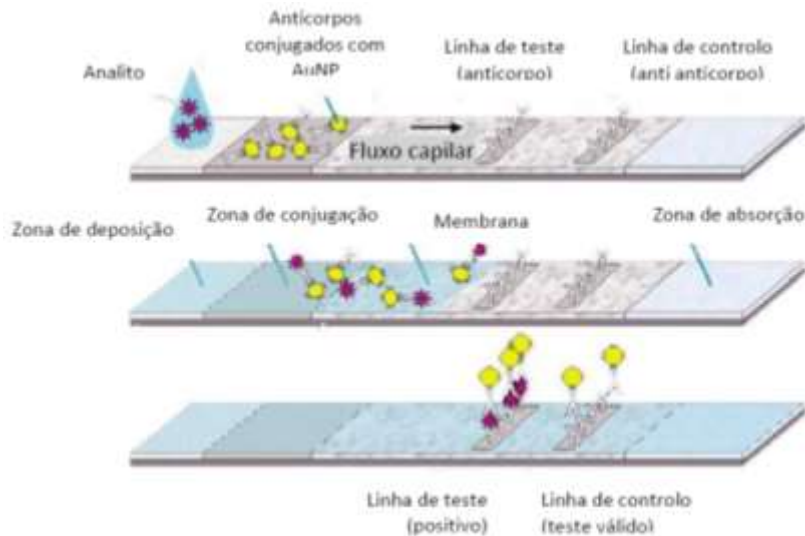
A tecnologia associada aos ensaios de fluxo lateral foi descrita pela primeira vez na década de 1960, embora a sua primeira aplicação comercial tenha sido lançada apenas em 1988 pela Unipath Clearview, consistindo num teste de gravidez caseiro <sup>[16, 35]</sup>.

Estes testes são normalmente utilizados para diagnósticos médicos ou em contexto laboratorial, apresentando uma vasta gama de aplicações das quais se podem destacar, para além do típico teste de gravidez caseiro, os testes de HIV, malária, gripe aviária, doenças respiratórias, drogas de abuso, fertilidade, entre outros <sup>[36, 37]</sup>. Os testes clínicos podem ser efetuados com amostras de sangue, urina, saliva ou fezes <sup>[38]</sup>.

Os LFAs baseados nos princípios da imunocromatografia são dispositivos simples que têm como objetivo detetar a presença ou ausência de um determinado analito-alvo na amostra. São constituídos por uma sequência de segmentos que incluem a zona de deposição da amostra, a zona de conjugação (onde é colocado outro analito que se ligará à amostra), a membrana de reação (local onde ocorre a deteção) e a zona de absorção (que atua como um recipiente de resíduos) (**Figura 2.3**) <sup>[35]</sup>.

Embora seja possível fazer diversas variações destes testes, todos eles têm em comum a formação de um complexo entre um reagente detetor ligado a partículas coloridas (que migram na corrente da amostra) e um reagente de captura específico que se encontra ligado à membrana na posição da linha de teste. São projetadas pelo menos duas linhas: a linha de teste na qual o reconhecimento entre um alvo e a amostra originará um resultado

positivo (ou negativo caso não ocorra reconhecimento), e a linha de controlo cuja resposta positiva confirma a validade do dispositivo. É também viável medir a intensidade da linha de teste de forma a determinar a quantidade de analito presente na amostra <sup>[12, 39]</sup>.



**Figura 2.3:** Arquitetura de um ensaio de fluxo lateral. Adaptado de <sup>[35]</sup>.

Para além de não requererem preparação prévia das amostras ou reagentes utilizados, os ensaios de fluxo lateral demoram poucos minutos a revelar os resultados, existindo geralmente uma correlação entre tempo e sensibilidade – testes mais sensíveis podem precisar de mais tempo para a revelação <sup>[27]</sup>.

As principais desvantagens dos LFAs são fundamentalmente a baixa sensibilidade dos testes, o consumo de amostra relativamente elevado, a flexibilidade limitada no desenho do ensaio e a necessidade de uma linha de controlo para cada parâmetro <sup>[40]</sup>.

### 2.2.1.2. Dispositivos de análise de microfluídica em papel ( $\mu$ PADs) em formato 3D

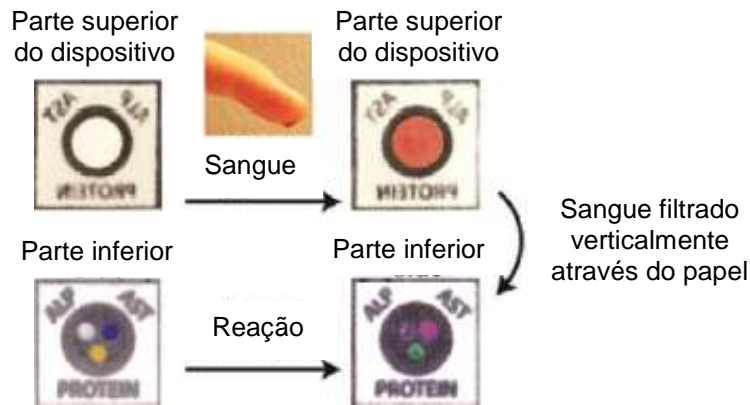
Face aos inconvenientes mencionados anteriormente no que diz respeito aos LFAs, Whitesides *et al.* apresentaram pela primeira vez, em 2008, o formato 3D para  $\mu$ PADs <sup>[1]</sup>. Estes consistem na sobreposição de camadas de papel padronizadas que permitem o fluxo intercamadas, para além do fluxo lateral. A possibilidade do fluxo intercamadas (ou fluxo vertical) acrescenta liberdade à formação de percursos, a qual pode ser aproveitada para a construção de uma rede de canais mais complexa.

Assim sendo, o formato 3D apresenta um conjunto de vantagens em relação aos dispositivos de fluxo lateral, nomeadamente: **i)** a capacidade de obter um maior número de ensaios numa área menor; **ii)** uma distribuição de amostra mais rápida (o fluxo vertical é consideravelmente mais rápido que o lateral tendo em conta a espessura do papel); **iii)** a possibilidade de efetuar múltiplos ensaios em paralelo utilizando um baixo volume de amostra; **iv)** cada camada do dispositivo pode ser de um tipo de papel indicado para uma função específica <sup>[41]</sup>.



Os dispositivos de análise de microfluídica em papel em formato 3D podem ser construídos de várias formas: com o recurso a camadas de adesivo que permitam o contacto das camadas de papel em pontos específicos, através da técnica *origami* que permite a sobreposição de zonas padronizadas através de dobragens sucessivas de uma única folha de papel, ou ainda com o recurso a adesivo de *spray* que é depositado nas camadas de papel com o propósito de as unir <sup>[41–43]</sup>. Relativamente ao método de fabrico das regiões hidrofóbicas nas camadas de papel, este não é relevante para a construção dos dispositivos 3D desde que permita a sua sobreposição.

O formato 3D para  $\mu$ PADs já foi aplicado a biossensores com o objetivo de detetar analitos como glucose e algumas proteínas como por exemplo alanina transaminase (ALT – *Alanine Transaminase*), aspartato transaminase (AST – *Aspartate Transaminase*), fosfatase alcalina (ALP – *Alkaline Phosphatase*) e albumina de soro bovino (BSA – *Bovine Serum Albumin*) (**Figura 2.4**) <sup>[40, 42, 44, 45]</sup>.



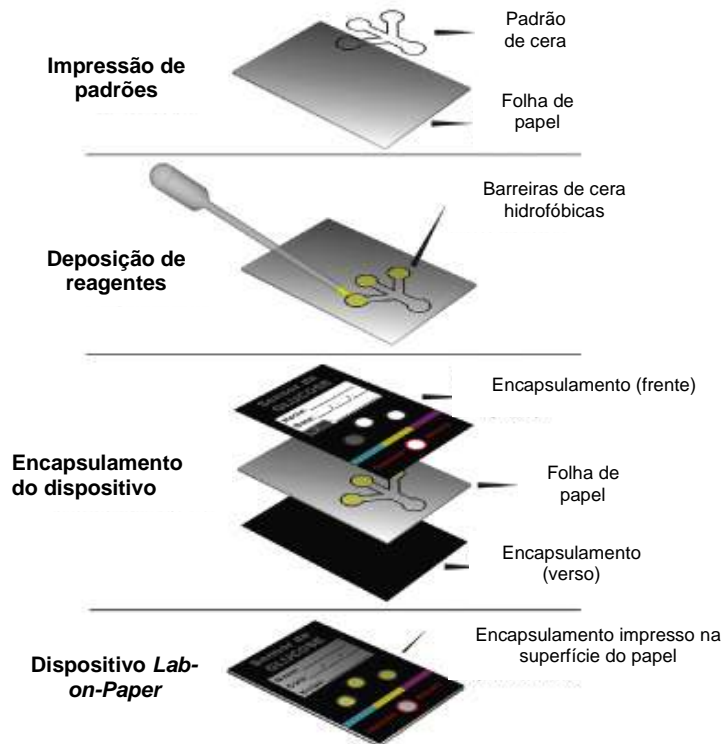
**Figura 2.4:** Exemplo de um dispositivo de microfluídica em papel em formato 3D para análise de múltiplos analitos em amostras de sangue. Adaptado de Vella *et al.* <sup>[44]</sup>.

## 2.2.2. Tecnologia *Lab-on-Paper*

A tecnologia *Lab-on-Paper* explora as propriedades/vantagens oferecidas pelo papel, para aplicação do mesmo no desenvolvimento de dispositivos de diagnóstico que permitam assegurar simultaneamente uma fácil utilização e obtenção de resultados e uma redução da quantidade de reagentes e amostras biológicas consumidos.

Nestes dispositivos, a contaminação entre amostras contíguas é evitada através da criação de barreiras hidrofóbicas que delimitam as zonas hidrofílicas, onde a reação ocorre. Para tal, é normalmente utilizada a técnica de impressão a cera, descrita pela primeira vez em 2009 por Carrilho, Martinez & Whitesides <sup>[46, 47]</sup>, e que compreende cinco etapas fundamentais (**Figura 2.5**): **i)** desenho dos padrões de cera hidrofóbicos em *software* informático; **ii)** impressão a cera dos padrões desenhados; **iii)** difusão dos padrões de cera por toda a espessura do papel, por aquecimento do mesmo; **iv)** deposição e secagem dos reagentes necessários às reações colorimétricas específicas; **v)** impressão e montagem do encapsulamento.

Relativamente aos resultados colorimétricos obtidos, estes podem ser analisados visualmente ou digitalmente (através de *software* informático).



**Figura 2.5:** Esquema da sequência de etapas envolvidas no fabrico de dispositivos *Lab-on-Paper*. Adaptado de Costa *et al.* <sup>[25]</sup>.

### 2.3. (Bio)Nanotecnologia

A Nanotecnologia é “a engenharia das coisas extremamente pequenas”, que estuda a conceção, desenvolvimento e manipulação de materiais ou componentes a uma escala nanométrica. Baseia-se na possibilidade de miniaturização de estruturas e dispositivos, podendo ser aplicada de forma altamente promissora nas mais diversas áreas (ex: medicina, eletrónica, física, química, biologia ou engenharia de materiais) <sup>[48]</sup>.

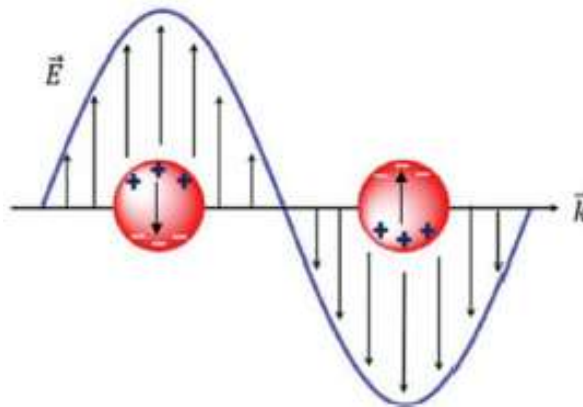
Os materiais utilizados na área da Nanotecnologia denominam-se nanomateriais e possuem dimensões tipicamente entre 1 – 100 nm (ex: nanopartículas metálicas), apresentando normalmente propriedades distintas daquelas que o mesmo material apresenta à escala macroscópica <sup>[49, 50]</sup>.

A Bionanotecnologia baseia-se na combinação entre os nanomateriais e as biomoléculas (ex: proteínas, lípidos, anticorpos, etc.), estabelecendo assim uma ligação entre a Nanotecnologia e a Biotecnologia.

### 2.3.1. Nanopartículas metálicas

Nanopartículas são estruturas intermédias entre os materiais e as estruturas atômicas ou moleculares, cujas propriedades diferem das propriedades do mesmo material à macroescala. Por exemplo, embora o ouro seja amarelo, uma suspensão coloidal de nanopartículas de ouro (AuNPs) sintetizadas por via coloidal apresenta cores entre o vermelho e o azul/roxo <sup>[51]</sup>. Estas propriedades dependem do tamanho e devem-se ao aumento da contribuição de átomos à superfície e consequentemente ao aumento da área superficial das nanopartículas, comparativamente aos materiais à escala macroscópica, sendo determinadas pelo tipo de movimento que os elétrons realizam no espaço em que estão confinados <sup>[52, 53]</sup>.

A diversidade de cores observada nas nanopartículas está relacionada com as oscilações dos elétrons de condução que, em ressonância com a luz incidente, formam uma ressonância plasmónica de superfície (SPR – *Surface Plasmon Resonance*). O campo elétrico da radiação incidente induz a formação de um dipolo na nanopartícula, que promove o aparecimento de uma força restauradora responsável por compensar o desequilíbrio provocado pela distorção das cargas (**Figura 2.6**) <sup>[54]</sup>.



**Figura 2.6:** Formação da ressonância plasmónica de superfície (SPR) <sup>[54]</sup>.

Para as nanopartículas metálicas, a frequência da plasmónica situa-se na zona visível do espectro eletromagnético, gerando uma forte absorção nessa zona que se traduz numa intensa coloração destas suspensões coloidais. A posição e a forma da banda plasmónica de superfície no espectro ultravioleta-visível (UV-Vis) dependem de fatores como o tamanho e a geometria das nanopartículas, das interações entre elas e do índice de refração do meio <sup>[55–57]</sup>.

A interação entre nanopartículas é provavelmente o fator que mais influência tem sobre a banda plasmónica de superfície. À medida que a distância entre as nanopartículas em suspensão diminui, a banda plasmónica vai sofrendo desvios para comprimentos de onda maiores, ficando cada vez mais alargada. Quando a separação entre as nanopartículas é muito pequena, estas comportam-se como nanopartículas de grandes dimensões, formando um filme metálico contínuo e acabando por perder a absorção no espectro UV-Vis devido às interações dipolo-dipolo adjacentes <sup>[55, 58]</sup>.

A elevada energia superficial das nanopartículas metálicas, que favorece a rápida agregação das mesmas, dificulta a obtenção de suspensões coloidais estáveis. Face a este problema, o processo de síntese é habitualmente efetuado na presença de espécies estabilizadoras que adsorvem na superfície das nanopartículas, formando uma camada protetora que impede a agregação das mesmas <sup>[59]</sup>.

### 2.3.2. Nanopartículas de ouro (AuNPs)

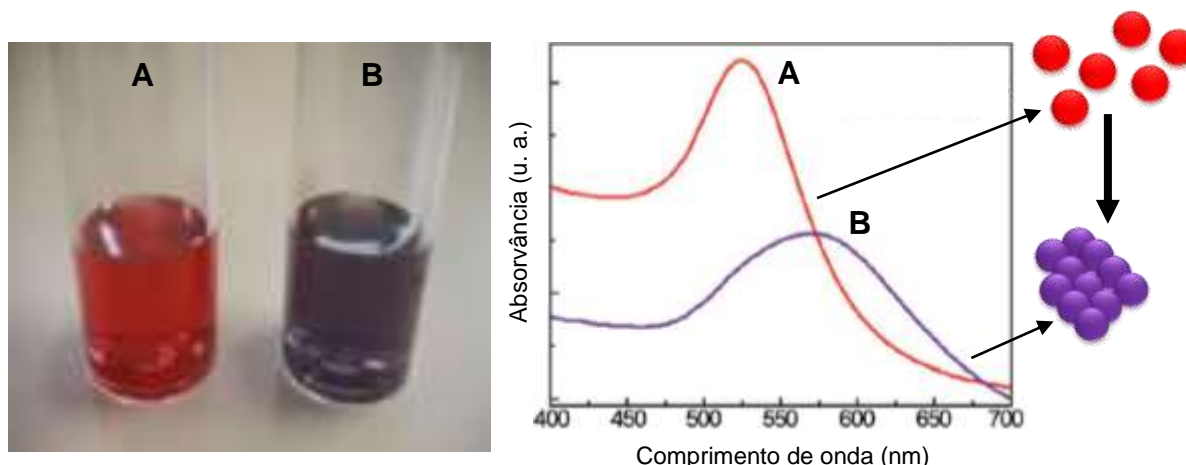
AuNPs são conjuntos de átomos de ouro que possuem um comportamento espectral ajustável e facilidade de funcionalização com biomoléculas como anticorpos ou DNA, propriedades que estimulam a sua aplicação na biomedicina em ensaios de reconhecimento molecular extremamente sensíveis, específicos e económicos <sup>[60, 61]</sup>.

As AuNPs podem ser facilmente sintetizadas por redução de um sal de ouro e funcionalizadas com oligonucleótidos tiolados, denominando-se Au-nanossondas <sup>[62]</sup>. A característica física mais importante destas nanopartículas é o seu tamanho, o qual influencia propriedades como a área específica de superfície, a viscosidade e o comportamento de agregação das mesmas <sup>[63]</sup>.

Embora existam várias formas de sintetizar AuNPs, o método mais comum foi introduzido por Turkevich em 1951 e baseia-se na utilização de soluções aquosas nas quais o ião citrato funciona como agente redutor do ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) (redução de  $\text{Au}^{3+}$  para  $\text{Au}^0$ ) e estabilizador coloidal por intermédio de repulsões eletrostáticas. A ligação do ião citrato à superfície da nanopartícula é relativamente fraca, o que facilita possíveis reações de substituição <sup>[64, 65]</sup>.

No entanto, estudos mais recentes demonstraram que a glucose possui a capacidade de atuar simultaneamente como agente redutor e estabilizador de sais de metais nobres como o ouro, propriedade que pode ser aproveitada para uma síntese mais simples, rápida e ecológica de AuNPs <sup>[66, 67]</sup>. A alteração da concentração do agente redutor, neste caso a glucose, resulta na formação de nanopartículas de diferentes formas e tamanhos, o que por sua vez provocará alterações na cor da solução <sup>[68]</sup>.

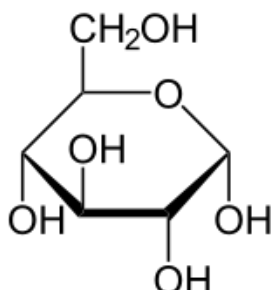
AuNPs com dimensões entre 10 – 20 nm assumem uma intensa coloração vermelha, resultante da frequência à qual se verifica a SPR (520 nm). Contudo, a sua agregação provoca um deslocamento da banda SPR para comprimentos de onda mais elevados (600 nm) e uma mudança de cor para azul (**Figura 2.7**) <sup>[69]</sup>. Essa mudança de cor pode, por conseguinte, ser utilizada na deteção colorimétrica de amostras com diferentes concentrações de glucose <sup>[68]</sup>.



**Figura 2.7:** Soluções coloidais e respectivos espectros UV-Vis associados a AuNPs (A) antes e (B) após agregação das mesmas. Adaptado de Guo *et al.* <sup>[69]</sup>.

## 2.4. Glucose

A glucose ( $C_6H_{12}O_6$ ) (**Figura 2.8**) é um cristal sólido de sabor adocicado, encontrado na natureza na forma livre ou combinada. Este monossacarídeo constitui a principal fonte de energia das células do organismo humano e funciona como intermediário metabólico, sendo transportado desde os intestinos ou do fígado até às células através da corrente sanguínea <sup>[70]</sup>.



**Figura 2.8:** Fórmula estrutural da glucose <sup>[70]</sup>.

Normalmente, a concentração de glucose no sangue em humanos varia no intervalo de 2,8 – 6,1 mM, ou seja, aproximadamente entre 50 – 110 mg/dL (valores de referência). Contudo, este valor tende a variar durante o dia: os valores mais baixos são detetados de manhã em jejum, aumentando geralmente após as refeições.

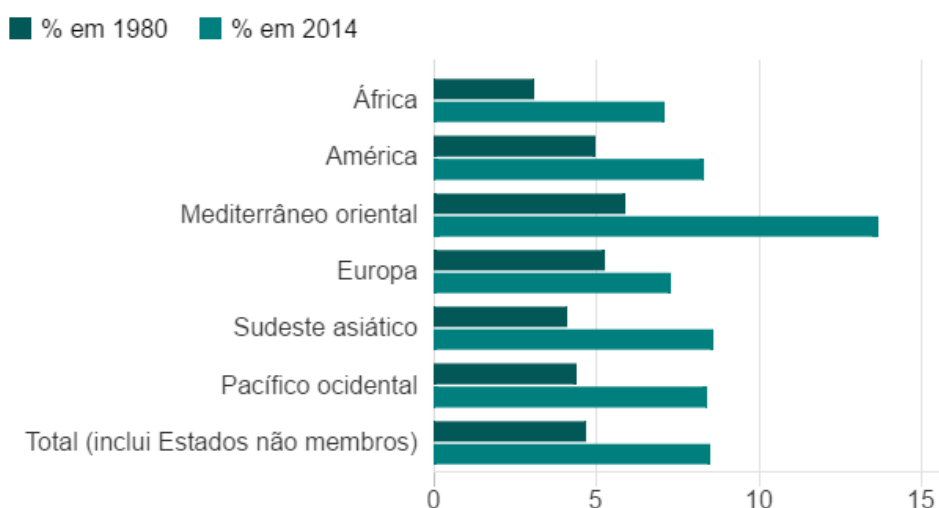
Uma concentração de glucose no sangue fora dos intervalos normais pode ser indicadora de várias doenças. Uma elevada concentração de açúcar no sangue (superior a 110 mg/dL) denomina-se hiperglicemia, enquanto uma concentração inferior a 50 mg/dL é denominada hipoglicemia <sup>[71]</sup>.

### 2.4.1. Diabetes

A diabetes é uma doença crónica provocada pela deficiência na produção de insulina (hormona que regula a concentração de açúcar no sangue) pelo pâncreas ou pela incapacidade de utilização da mesma por parte do organismo.

Existem dois tipos de diabetes: tipo I – resulta da produção insuficiente de insulina, obrigando os pacientes à administração diária desta hormona; desconhecem-se as possíveis causas da doença, não existindo atualmente medidas preventivas; e tipo II – advém do uso ineficaz da insulina produzida e engloba cerca de 95% dos afetados pela doença mundialmente <sup>[72]</sup>; deve-se sobretudo ao excesso de peso e à inatividade física. Pode considerar-se ainda um terceiro tipo de diabetes – a diabetes gestacional – que ocorre durante a gravidez, sendo normalmente diagnosticada nas consultas pré-natais.

De acordo com dados divulgados recentemente pela OMS, existiam em 2014 cerca de 422 milhões de casos de diabetes em todo o mundo, quase o quádruplo dos 108 milhões registados em 1980 (**Figura 2.9**), sendo previsível que estes números continuem a aumentar. Estima-se também que 3,7 milhões de pessoas tenham morrido devido a consequências dos elevados níveis de açúcar no sangue, tendo 43% dessas mortes ocorrido antes dos 70 anos. Para além disso, a maior parte das mortes causadas pela diabetes ocorrem em países com menores capacidades económicas <sup>[73]</sup>.



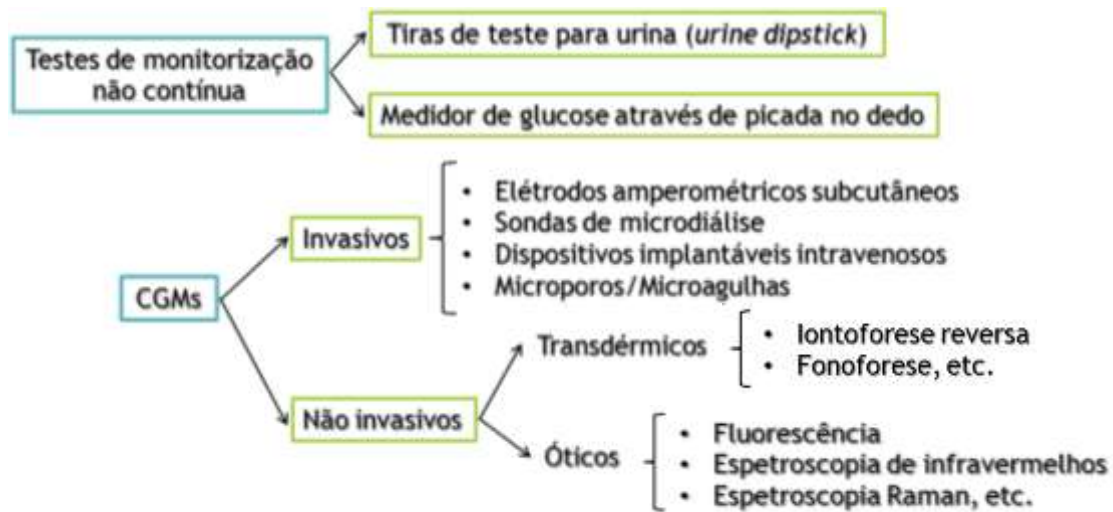
**Figura 2.9:** Estimativa da prevalência da diabetes em adultos nas regiões da OMS <sup>[73]</sup>.

No que diz respeito a Portugal, dados do Observatório Nacional da Diabetes (OND) dão conta de um crescimento acentuado do número de novos casos diagnosticados e de mortes provocadas pela doença em 2015, com valores que se aproximam dos máximos registados em 2010 e 2011. Por dia, são cerca de 168 novos casos (7 a cada hora), o que corresponde a mais 20 face a 2014. Para além disso, em média 12 pessoas perderam a vida, por dia, no mesmo ano (4 406 no total), resultado da diabetes, com mais de um quarto dos óbitos registados nos hospitais do Serviço Nacional de Saúde (SNS) a serem atribuídos a pessoas com diabetes. O mesmo estudo mostra uma prevalência estimada de 13,3% na população portuguesa com idades entre os 20 e os 79 anos, o que corresponde a mais de um milhão de pessoas com diabetes nesta faixa etária, às quais se juntam mais de dois milhões com pré-diabetes <sup>[74]</sup>.

### 2.4.2. Estado da arte na detecção de glucose

Embora não seja ainda conhecida qualquer cura para a diabetes, os seus sintomas e complicações podem ser minimizados através não só de medicação específica mas também da monitorização dos níveis de glucose, sobretudo no sangue.

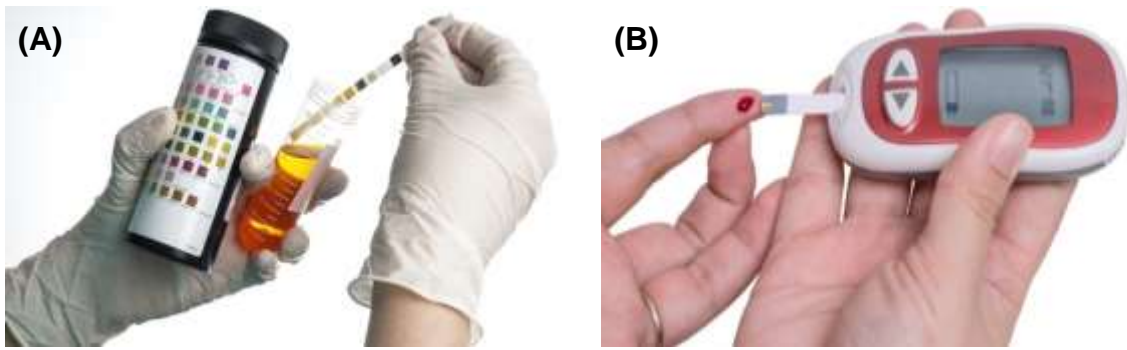
Os biossensores utilizados para detecção de glucose podem ser classificados em dois grandes grupos, com base na duração do método de medição: testes de monitorização não contínua (*point sample tests*) e sensores de monitorização contínua de glucose (CGMs – *Continuous Glucose Monitors*) (Figura 2.10) <sup>[72, 75]</sup>.



**Figura 2.10:** Tecnologias existentes e em desenvolvimento para detecção de glucose. Adaptado de Oliver *et al.* <sup>[75]</sup>.

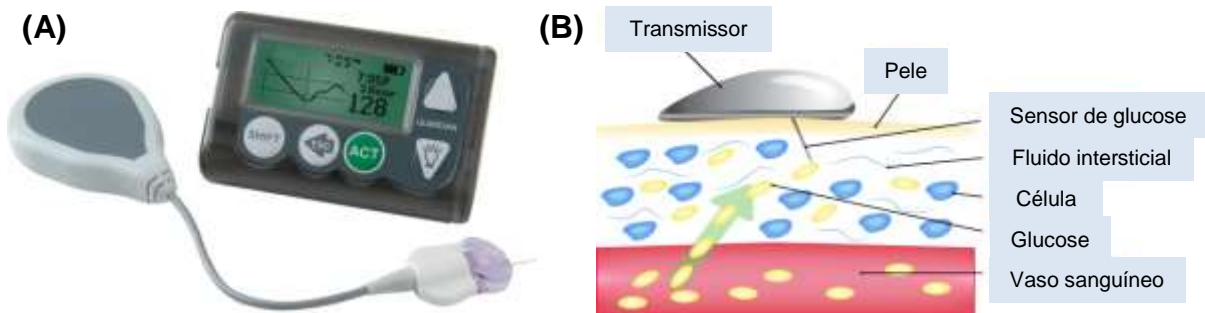
Relativamente aos testes de monitorização não contínua, a primeira patente de um sensor de glucose no sangue para a realização de testes *point-of-care* em doentes com diabetes foi registada em 1971 nos EUA por Anton Clemens. O Medidor de Refletância de Ames (ARM – *Ames Reflectance Meter*) era um dispositivo capaz de detetar a luz refletida e de avaliar automaticamente as mudanças de cor em tiras de teste através de reações enzimáticas. Posteriormente, outros biossensores para avaliação colorimétrica e eletroquímica dos níveis de glucose no sangue ou na urina têm sido desenvolvidos e otimizados (Figura 2.11), com base na detecção de produtos de reações de oxidação/redução catalisadas enzimaticamente, cuja concentração é proporcional à concentração de glucose nas amostras <sup>[75]</sup>.





**Figura 2.11:** Testes de monitorização não contínua dos níveis de glucose: **(A)** colorimétricos (*urine dipstick*); **(B)** eletroquímicos (medidor de glucose no sangue através de picada no dedo).

Os CGMs são biossensores enzimáticos que permitem monitorizar continuamente e em tempo real os níveis de glucose. Os dispositivos CGM mais comuns são invasivos, constituídos por um sensor de glucose que consiste num pequeno eléctrodo inserido subcutaneamente, normalmente no abdómen, de forma a medir os níveis de glucose no fluido intersticial. A glucose oxidase e o mediador são imobilizados sobre uma membrana polimérica na superfície do eléctrodo, e as reações de oxidação/redução geram uma corrente dependente da concentração de glucose que é medida eletroquimicamente. Este sensor é conectado a um transmissor que envia as informações através de radiofrequência sem fios para um aparelho de monitorização e exibição (**Figura 2.12**)<sup>[76, 77]</sup>.



**Figura 2.12:** **(A)** Constituição e **(B)** modo de funcionamento de um dispositivo CGM para monitorização dos níveis de glucose. Adaptado de<sup>[78]</sup>.

Para além da deteção e registo, estes dispositivos permitem ainda notificar e alertar o paciente em caso de variação brusca ou de aproximação a níveis indesejáveis de glucose, havendo já alguns sistemas que funcionam simultaneamente como bombas de infusão de insulina (**Tabela 2.3**)<sup>[77]</sup>.



**Tabela 2.3:** Comparação de diferentes dispositivos CGM comercializados atualmente. Adaptado de Wang e Lee <sup>[72]</sup>.

Marca	Guardian Real-Time	MiniMed 530G com Enlite	Dexcon G4 Platinum	FreeStyle
Empresa	Medtronic	Medtronic	Dexcon	Abbott
Data de aprovação pela FDA ( <i>Food and Drug Administration</i> )	2006	2007	2007	2008
Vida do sensor (d)	3	6	7	5
Tipo de sensor	Inserido sob a pele	Inserido sob a pele	Inserido sob a pele	Inserido sob a pele
Tempo de inicialização (h)	2	2	2	10
Calibração por <i>finger-stick test</i>	2h após a inserção, nas primeiras 6h, e depois a cada 12h	2h após a inserção, nas primeiras 6h, e depois a cada 12h	a cada 12h	aproximadamente 1, 2, 10, 24 e 72h após a inserção

Tecnologias não invasivas têm vindo também a ser estudadas como alternativa às existentes, como é o caso do GlucoWatch (2001), um sistema transdérmico baseado em iontoforese reversa, colocado no pulso como um relógio e que consiste num hidrogel localizado entre a pele e um elétrodo. Uma pequena corrente do elétrodo passa através do hidrogel, extraindo o fluido intersticial da pele para o elétrodo iontoforético. A concentração de glucose na amostra é mil vezes menor que a do fluido intersticial. O GlucoWatch foi no entanto retirado do mercado em 2008 devido a dificuldades de operação, necessidade de calibração e irritação da pele <sup>[72, 79]</sup>.

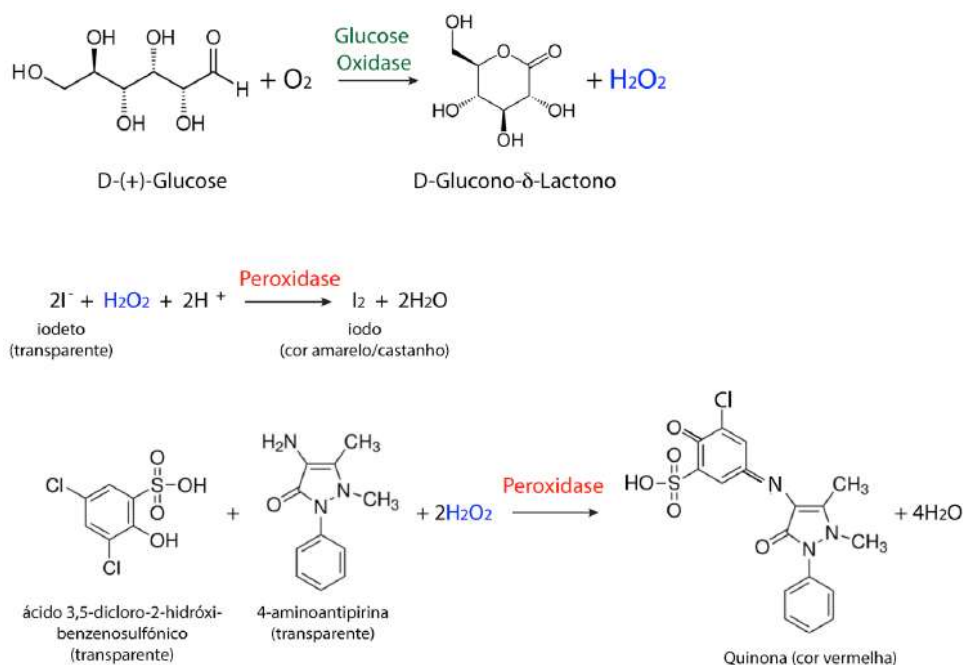
#### 2.4.2.1. *Lab-on-Paper*: deteção de glucose

No que diz respeito à utilização do papel como substrato para a deteção de glucose, Costa (2012) <sup>[10]</sup> propõe o desenvolvimento de um dispositivo enzimático para determinação colorimétrica da concentração de glucose em soluções biológicas, que pretende ser simples, prático e económico, características essenciais para a aplicação em testes *point-of-care*.

O mecanismo de deteção de glucose baseia-se na combinação entre um sistema de duas enzimas e dois indicadores de oxidação/redução: por ação da glucose oxidase, a glucose é oxidada em ácido glucónico e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ); este último será posteriormente utilizado para oxidar os dois indicadores utilizados (KI e AB), numa reação catalisada pela peroxidase. A oxidação destes indicadores traduzir-se-á numa alteração colorimétrica, que permitirá então quantificar a concentração de glucose na amostra <sup>[71, 80, 81]</sup>. A utilização de

múltiplos indicadores visa abranger uma maior gama de concentrações de glucose detetadas, permitindo consequentemente aumentar a discriminação visual dos resultados obtidos <sup>[11]</sup>.

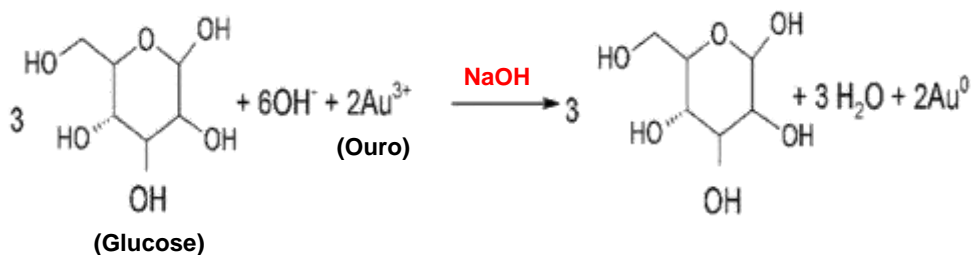
A **Figura 2.13** apresenta o conjunto das reações associadas ao processo anteriormente descrito.



**Figura 2.13:** Reações enzimáticas na base da determinação colorimétrica da concentração de glucose em amostras biológicas <sup>[10]</sup>.

Não obstante a sua fiabilidade e precisão, os biossensores enzimáticos revelam-se extremamente sensíveis a variações de temperatura e de pH, não podendo como tal ser armazenados por longos períodos de tempo <sup>[68]</sup>. Para além disso, a utilização de enzimas promove o encarecimento do dispositivo.

Neste trabalho, será então proposto o desenvolvimento de um biossensor colorimétrico não enzimático em papel, baseado na síntese de AuNPs por redução de um sal de ouro pela glucose. A reação química associada à redução do sal de ouro encontra-se apresentada na **Figura 2.14**. A alteração da concentração do agente redutor resulta na formação de AuNPs com diferentes dimensões, o que se reflete na mudança de cor das mesmas e pode ser utilizado no processo de determinação colorimétrica dos níveis de glucose.



**Figura 2.14:** Reação química de redução do ouro pela glucose, associada à síntese de AuNPs, para determinação colorimétrica da concentração de glucose em amostras através de um processo não enzimático. Adaptado de Suvana *et al.* <sup>[82]</sup>.

## Capítulo 3

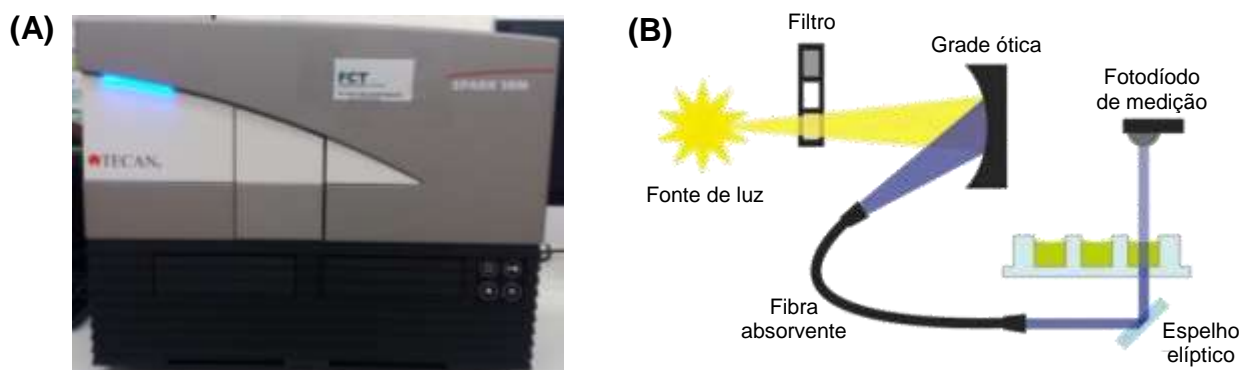
### 3. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

Neste capítulo é apresentada uma breve descrição de cada uma das diferentes técnicas de caracterização utilizadas ao longo do presente trabalho, as quais foram selecionadas com o propósito de analisar e obter informação o mais detalhada e complementar possível acerca das AuNPs sintetizadas tanto no estudo em solução como no sensor de papel, no que diz respeito à sua estrutura e morfologia. As técnicas descritas foram também aplicadas na caracterização de alguns dos materiais e reagentes utilizados ao longo do trabalho.

#### 3.1. Espectrofotometria de UV-Vis

A espectrofotometria é uma técnica analítica que utiliza a luz com o objetivo de medir as concentrações das soluções, através da interação da luz com a matéria. Quando um feixe de luz com um determinado comprimento de onda interage com uma amostra de cor branca a luz será totalmente refletida, sendo em contrapartida totalmente absorvida caso a amostra possua uma cor preta. Contudo, se apenas uma fração de luz for absorvida e a restante refletida, a cor da amostra pode ser determinada através da luz refletida (refletância) ou absorvida (absorvância) pela amostra. O fenómeno associado à espectrofotometria de absorvância é a absorção. As substâncias incolores não absorvem na gama de comprimentos de onda da zona do visível, nesses casos a absorção ocorrerá na zona infravermelha ou ultravioleta do espectro eletromagnético [83, 84].

Neste caso, foi utilizada esta técnica de caracterização com o objetivo de obter o espectro UV-Vis das soluções de AuNPs sintetizadas. Utilizou-se o *TECAN SPARK 10M* (**Figura 3.1A**), um leitor de microplacas multifuncional equipado com um monocromador de alta velocidade (HSM – *High-Speed Monochromator*), que permite o varrimento completo do espectro de absorvância em poucos minutos. O sistema ótico do módulo de absorvância utilizado (**Figura 3.1B**) é composto por uma fonte luminosa (lâmpada de *flash* de xénon), cuja luz vai passar através de um filtro antes de ser focada na fenda de entrada do monocromador por um espelho condensador. Ao mover a grade ótica, o comprimento de onda da medição é selecionado e focado na fenda de saída do monocromador, onde a luz entra na fibra absorvente sendo conduzida sobre a amostra por um espelho elíptico. Uma parte dessa luz é refletida num fotodíodo de referência, sendo posteriormente coletada por uma lente e focada no fotodíodo de medição. No ponto focal, o feixe de luz absorvido possui um diâmetro de cerca de 1 mm. De referir ainda que o equipamento utilizado aceita formatos de placa de 1 – 384 poços, encontrando-se equipado com o *software SparkControl* para controlo do leitor e redução de dados.



**Figura 3.1:** (A) Equipamento *TECAN SPARK 10M*, utilizado na caracterização por espectrofotometria de UV-Vis; (B) Representação esquemática do sistema ótico associado ao módulo de absorvância utilizado.

### 3.2. Microscopia Eletrónica de Varrimento e de Transmissão

A Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM – *Scanning Electron Microscopy*) é uma importante e versátil técnica de caracterização, que torna possível a recolha de informação morfológica acerca do material em estudo através da utilização de um feixe de eletrões altamente energético incidente na amostra, por forma a produzir uma imagem tridimensional da superfície do material, de elevada resolução e com uma profundidade de campo de 30  $\mu\text{m}$ . As imagens produzidas são semelhantes às obtidas por microscopia ótica de reflexão, mas numa gama de ampliação muito superior (até 500 000 vezes) e sem qualquer perda de nitidez, devido ao facto do comprimento de onda do feixe de eletrões utilizado ( $\lambda_e = 0,012 \text{ nm}$ ) ser muito inferior ao dos fotões de luz visível ( $400 \text{ nm} < \lambda_{\text{visível}} < 700 \text{ nm}$ ) <sup>[10, 85]</sup>.

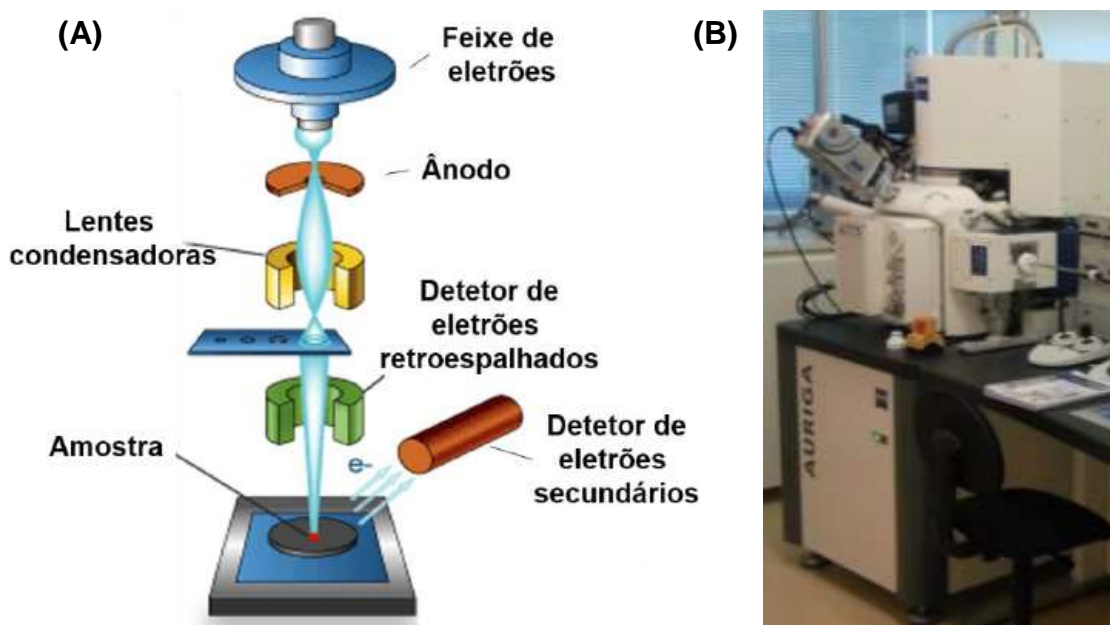
O microscópio eletrónico de varrimento (**Figura 3.2A**) é constituído por uma fonte de eletrões, um sistema de lentes eletromagnéticas, bobinas de varrimento, um coletor de eletrões e um tubo de raios catódico (CRT – *Cathode Ray Tube*). O princípio físico de funcionamento da SEM baseia-se na emissão de um feixe de eletrões (elétrodo negativo) por um filamento capilar de tungsténio mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar entre 0,5 e 30 kV. Os eletrões são acelerados em direção ao elétrodo positivo, sendo a correção da direção do feixe nesse percurso efetuada por lentes condensadoras que alinham o feixe em direção à abertura da lente objetiva, responsável pelo ajustamento do foco do feixe. O varrimento da superfície da amostra em análise pelo feixe eletrónico incidente, seguido da amplificação e processamento adequados, resultará então na formação da imagem de SEM convencional <sup>[10,86]</sup>. Para cada ponto da amostra onde incide o feixe de eletrões é efetuada a correspondência a um ponto (pixel) da imagem apresentada no monitor, que é proporcional à intensidade do sinal detetado no volume onde incide o feixe eletrónico primário. Assim, a imagem obtida resulta de uma sincronização ponto a ponto com a amostra, correspondendo a sua ampliação ao rácio entre a dimensão do CRT e a dimensão da porção da amostra percorrida pelo feixe <sup>[87]</sup>.

A SEM permite obter imagens da topografia da superfície, utilizando o padrão de difração de eletrões secundários (emitidos pelos átomos excitados pelo feixe de eletrões). Para

além disso, o padrão de elétrons retrodifundidos proporciona imagens com diferença de contraste de acordo com o elemento que está a ser analisado, sendo que elementos pesados (ex: ferro) aparecem mais claros e elementos leves (ex: carbono) aparecem mais escuros <sup>[86]</sup>.

No caso da Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM – *Transmission Electron Microscopy*), o feixe de elétrons interage com a amostra suficientemente fina de modo a permitir a passagem dos elétrons e colocada entre a fonte de elétrons e uma tela na qual a imagem ampliada é formada pelo impacto dos elétrons transmitidos e difratados. A imagem gerada é uma projeção bidimensional da amostra, apresentando alta resolução espacial <sup>[88]</sup>.

Nesta situação, foram utilizadas a SEM e a TEM com o propósito de caracterizar as AuNPs sintetizadas no que diz respeito à sua morfologia. No caso da SEM, esta foi também usada na caracterização morfológica dos diferentes substratos de papel analisados. Para tal, utilizou-se o equipamento *Zeiss AURIGA CrossBeam SEM-FIB* (**Figura 3.2B**) no modo de elétrons secundários, com uma tensão de aceleração de 2 kV, uma abertura de diafragma de 30  $\mu\text{m}$  e uma distância de trabalho entre a amostra e a coluna de SEM de 5,8 mm.



**Figura 3.2:** (A) Representação esquemática de um equipamento de SEM; (B) Equipamento Zeiss AURIGA CrossBeam SEM-FIB, utilizado na caracterização por SEM.

### 3.2.1. Espectroscopia Dispersiva de Raios-X

Para além de tornar possível a recolha de informação topográfica, o equipamento de SEM permite efetuar simultaneamente uma análise química elementar da superfície do material em estudo, através da Espectroscopia Dispersiva de Raios-X (EDS – *Energy Dispersive Spectroscopy*). Os detetores do SEM produzem um sinal proporcional ao número de fótons raios-X detetados na área de incidência do feixe de elétrons primários, o qual será então exibido como um espectro de intensidade ( $n^{\circ}$  de fótons registados) em função da voltagem, que corresponde às energias dos raios-X específicas para cada elemento presente na amostra <sup>[10]</sup>.

Uma vez que cada elemento emite um espectro de raios-X característico, os detetores podem ser ajustados por forma a passarem apenas uma gama de pulsos correspondentes ao pico de raios-X de um determinado elemento atômico presente na amostra. O resultado de milhares de varrimentos sobre uma zona específica da amostra permitirá então produzir uma imagem elementar ou um mapa raios-X com a distribuição espacial dos elementos constituintes dessa mesma amostra <sup>[89]</sup>.

Esta técnica está limitada à identificação de elementos de número atômico Z superior a 5, ou seja, mais pesados que o boro, sendo o limite de deteção na ordem das 200 ppm para elementos com picos bem definidos. Os dados obtidos por EDS podem ser quantificados através da comparação com referências elementares apropriadas e recorrendo a algoritmos computacionais. A resolução espacial é uma das principais desvantagens desta técnica, uma vez que é responsável por provocar a sobreposição de picos característicos <sup>[90]</sup>.

### 3.3. Difração de Raios-X

A Difração de Raios-X (DRX) é uma técnica não destrutiva utilizada para caracterizar estruturalmente um material com base na interação entre um feixe de raios-X e a geometria cristalina do material, permitindo identificar diferentes estruturas cristalinas presentes nesse material e analisar as suas propriedades estruturais.

A difração consiste num fenómeno de dispersão que envolve a cooperação de um conjunto de átomos, ocorrendo normalmente apenas quando o comprimento de onda do feixe é da mesma ordem de grandeza da distância entre os centros dispersores. Assim, considerando que numa estrutura cristalina os átomos se encontram periodicamente organizados em planos, funcionando como centros dispersores, um material cristalino, cuja distância interatômica ( $d$ ) possui a mesma ordem de grandeza do comprimento de onda dos raios-X que nele incidem, irá difratar o feixe. Sempre que a diferença de percurso entre os raios difratados ( $2d \sin\theta$ ) for igual a um múltiplo inteiro ( $n$ ) do comprimento de onda ( $\lambda$ ) da radiação incidente, ocorrerá interferência construtiva, verificando-se a lei de Bragg:

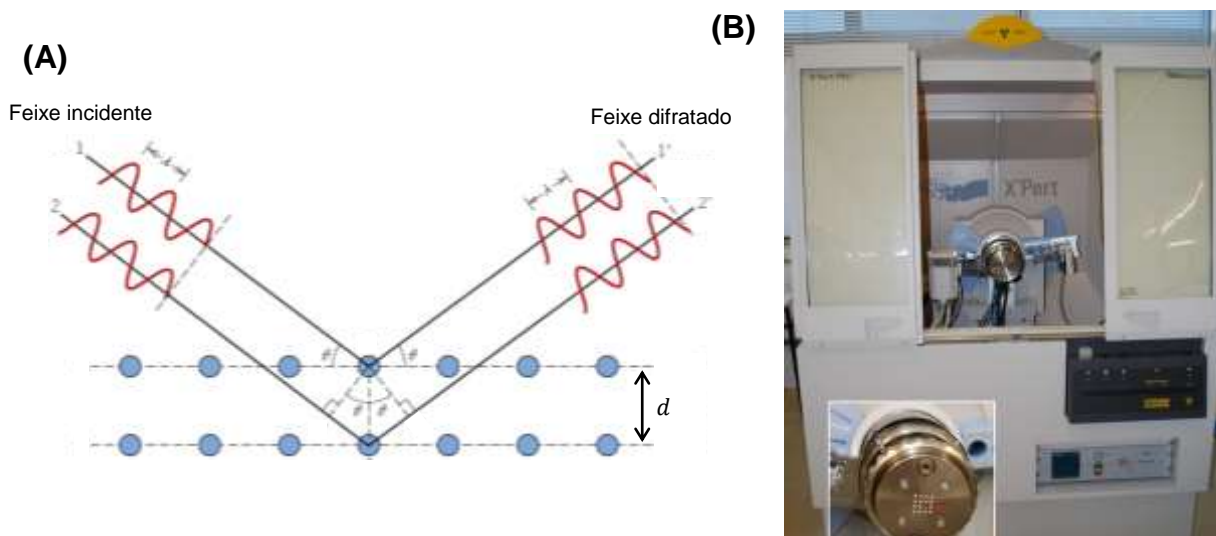
$$n\lambda = 2d \sin\theta \quad \text{Eq. 3.1}$$

onde  $\theta$  é o ângulo formado entre os planos atômicos e o feixe de raios-X incidente e difratado (ângulo de Bragg) (**Figura 3.3A**) <sup>[91]</sup>.

O funcionamento da DRX baseia-se na utilização de um feixe de raios-X de comprimento de onda conhecido, variando o seu ângulo de incidência e medindo a intensidade do feixe difratado. Obtém-se assim um difratograma no qual as interferências construtivas aparecem na forma de picos, e cuja comparação com diferentes estruturas armazenadas em bases de dados oficiais permitirá então determinar a geometria do material em estudo <sup>[92]</sup>.

Neste caso, as AuNPs produzidas foram analisadas por DRX, de modo a identificar as diferentes estruturas cristalinas nelas presentes, utilizando o equipamento *X'Pert PRO MPD* da *PANalytical* (**Figura 3.3B**) com uma ampola de cobre. Esta técnica foi também usada para caracterizar os diferentes substratos de papel utilizados. O padrão de difração foi adquirido

para ângulos entre  $10^\circ$  e  $90^\circ$  ( $2\theta$ ) com um passo de  $0,03^\circ$  ( $2\theta$ ), no método contínuo e operando a 45 kV e 40 mA.



**Figura 3.3:** (A) Representação esquemática da difração do feixe incidente pelos planos cristalográficos do material; (B) Equipamento X'Pert PRO MPD da PANalytical, utilizado na caracterização por DRX.

### 3.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

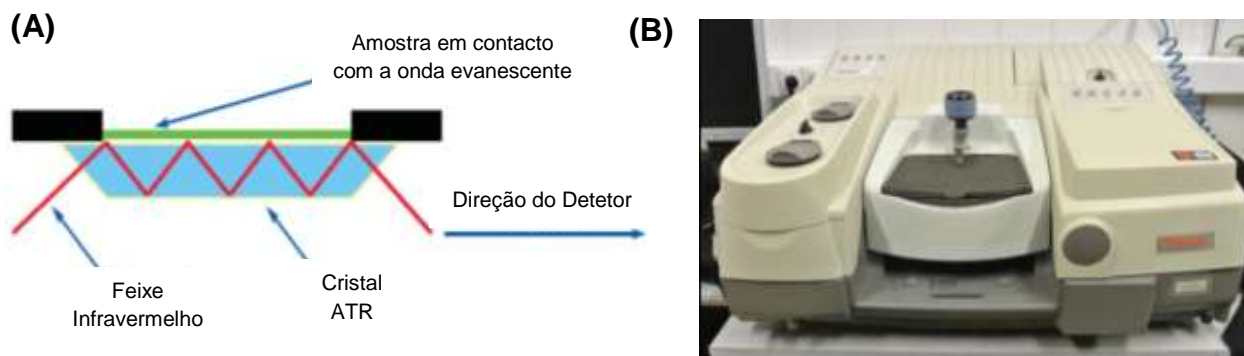
A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) é uma importante técnica de caracterização química que fornece informação acerca dos grupos funcionais presentes no material em estudo.

O princípio de funcionamento da FTIR baseia-se na determinação e quantificação da absorção sofrida por um feixe de radiação infravermelha ao interagir com as moléculas de um determinado composto, provocando alterações no estado vibracional das suas ligações covalentes, em função da frequência, comprimento de onda ou número de onda. O resultado obtido é um espectro de intensidade em função do número de onda (espectro infravermelho), o qual pode ser apresentado em função da transmitância ou da absorvância da amostra <sup>[93]</sup>.

Em amostras nas quais não seja possível medir a transmitância, por exemplo por serem opacas, pode utilizar-se uma configuração que permita medir a refletância – configuração ATR (*Attenuated Total Reflectance*). A interação entre o feixe infravermelho e a amostra é realizada na interface entre esta e um cristal ópticamente denso com um elevado índice de refração, através do qual o feixe é direcionado e refletido para trás em vários pontos ao longo do comprimento do cristal devido à alteração do índice de refração na sua superfície, até finalmente atingir o detetor. Quando a amostra é colocada em contacto com a superfície do cristal, o feixe vai interagir com a amostra em diversos pontos (**Figura 3.4A**) <sup>[94, 95]</sup>.

De modo a obterem-se os espectros de infravermelhos dos substratos de papel considerados, foi utilizado o equipamento Nicolet 6700 da Thermo Electron Corporation (**Figura 3.4B**) com um cristal ATR de diamante. Estes espectros foram adquiridos na região espectral de números de onda entre  $525$  e  $4500\text{ cm}^{-1}$ , sendo efetuados 32 *scans*.





**Figura 3.4:** (A) Esquema representativo de um sistema ATR com múltiplas reflexões. Adaptado de <sup>[95]</sup>, (B) Equipamento Nicolet 6700 da Thermo Electron Corporation, utilizado na caracterização por FTIR

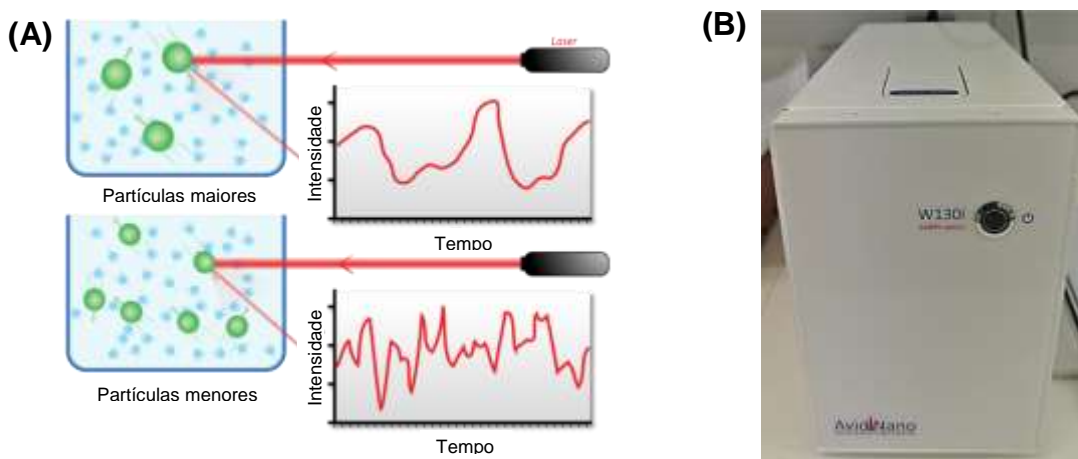
### 3.5. Dispersão Dinâmica da Luz

Dispersão Dinâmica da Luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*) é o nome dado a uma das técnicas de dispersão de luz mais utilizadas na determinação do tamanho de pequenas partículas em suspensão ou de polímeros em solução, pois permite o dimensionamento de partículas com até menos de 1 nm de diâmetro.

Pequenas partículas em suspensão encontram-se sujeitas a um movimento térmico aleatório (movimento Browniano), o que resulta na variação da distância entre os centros dispersores da luz. Quando a luz atinge essas partículas de pequenas dimensões, é dispersa em todas as direções, desde que o tamanho das partículas seja inferior ao comprimento de onda do fóton incidente. A este fenómeno dá-se o nome de dispersão de Rayleigh <sup>[96]</sup>.

O princípio de funcionamento da DLS baseia-se portanto na utilização de uma fonte luminosa (ex: *laser*), cuja luz ao interagir com a amostra vai ser dispersa em todos os sentidos e com intensidades diferentes. A análise destas variações de intensidade permitirá então obter informação sobre o tamanho e a distribuição de tamanho das partículas (**Figura 3.5A**) <sup>[97]</sup>.

A DLS é uma técnica muito importante na caracterização do raio hidrodinâmico de NPs, tendo sido usada neste trabalho para avaliação do diâmetro das AuNPs produzidas, utilizando o equipamento *AvidNano W130i SABRe optics* (**Figura 3.5B**).



**Figura 3.5:** (A) Representação esquemática do fenómeno de Dispersão Dinâmica da Luz em duas amostras hipotéticas formadas por partículas com diferentes tamanhos. Adaptado de <sup>[96]</sup>, (B) Equipamento *AvidNano W130i SABRe optics*, utilizado na caracterização por DLS.



### 3.6. Espectroscopia Raman

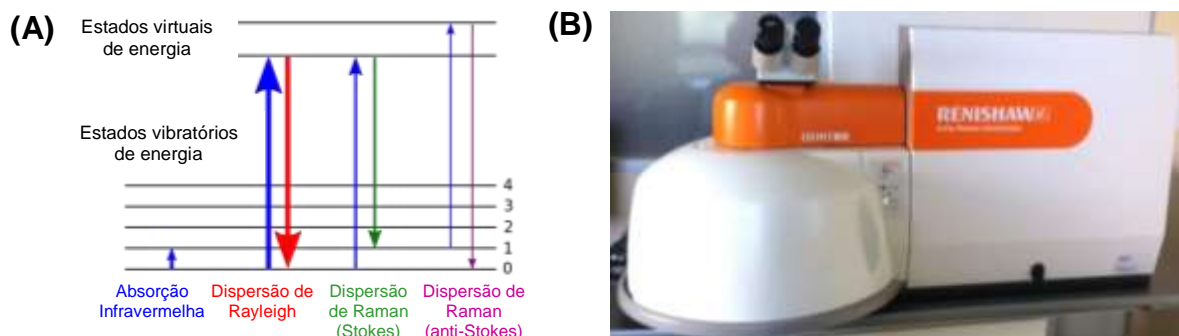
A espectroscopia Raman é uma técnica fotônica de alta resolução baseada na dispersão inelástica de luz monocromática, normalmente a partir de uma fonte *laser*, que visa fornecer informação química e estrutural acerca de quase todos os materiais, compostos orgânicos e inorgânicos, incluindo produtos farmacêuticos, produtos químicos finos, minerais e alimentos, permitindo assim a sua identificação.

Quando a luz monocromática, colimada, coerente e de determinada frequência interage com uma amostra do material a ser estudado, vai provocar a excitação de moléculas na sua constituição, induzindo dipolos oscilantes e sendo geralmente espalhada sem qualquer alteração em energia, ou seja, a maior parte da luz espalhada apresenta a mesma frequência da incidente (dispersão elástica ou de Rayleigh). No entanto, uma pequena porção da luz (1 em cada  $10^6$  fótons reemitidos) é espalhada inelasticamente, isto é, com uma frequência diferente da incidente. Este fenómeno é conhecido como dispersão inelástica ou de Raman, a qual por sua vez pode ser subdividida em dois tipos: Stokes (ocorre quando as moléculas recebem a energia no seu estado fundamental) e anti-Stokes (neste caso o fóton é absorvido por uma molécula que já está no estado vibratório excitado) (**Figura 3.6A**)<sup>[98]</sup>.

Como as moléculas vibram num determinado conjunto de frequências, essa alteração permite obter informações sobre transições vibratórias, rotativas e outras de baixa frequência em moléculas individuais, fornecendo um espectro Raman que funciona como impressão digital do material analisado<sup>[98, 99]</sup>.

Esta técnica é aplicada diretamente sobre a amostra em questão, permitindo caracterizar de forma rápida a composição química e a estrutura dessa mesma amostra, seja ela sólida (ex: partículas, *pellets*, filmes, fibras, etc.), líquida (ex: géis, pastas, etc.) ou gasosa. É necessária pouca ou nenhuma preparação dos materiais e é uma técnica *label-free*, o que reduz o potencial de artefactos. Para além disso, possui a vantagem de não provocar qualquer tipo de alteração na superfície na qual se faz a análise<sup>[98, 99]</sup>.

Neste trabalho, a caracterização dos substratos de papel considerados e das AuNPs sintetizadas por espectroscopia Raman foi efetuada com recurso ao Microscópio Raman, um equipamento da *Renishaw Qontor* (**Figura 3.6B**) com *lasers* de 532 e 633 nm, resolução espectral de  $0,3\text{ cm}^{-1}$  (FWHM – *Full Width at Half Maximum*), capacidade de mapeamento com 100 nm de resolução lateral e *autofocus* dinâmico em tempo real (característica única).



**Figura 3.6:** (A) Diagrama de níveis de energia com indicação dos estados energéticos envolvidos nas dispersões de Rayleigh e de Raman. Adaptado de <sup>[98]</sup>, (B) Microscópio Raman da Renishaw Qontor, utilizado na caracterização por espectroscopia Raman.

### 3.7. Análise Térmica

O termo Análise Térmica (TA – *Thermal Analysis*) refere-se a um conjunto de métodos analíticos que permitem estudar o comportamento de um número bastante considerável de materiais em função da temperatura, podendo como tal ser utilizados para obter informação acerca das reações de decomposição e/ou degradação que podem ocorrer.

A Análise Térmica engloba diversas técnicas, como por exemplo: a Termogravimetria (TG – *Thermogravimetry*), a Análise Térmica Diferencial (DTA – *Differential Thermal Analysis*), a Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC – *Differential Scanning Calorimetry*) e a Análise Termomecânica (TMA – *Thermomechanical Analysis*) <sup>[100]</sup>.

Neste trabalho, foram utilizadas em simultâneo as técnicas de Termogravimetria e de Calorimetria Diferencial de Varrimento na caracterização dos substratos de papel utilizados, com o propósito de avaliar o comportamento dos mesmos quando expostos a temperaturas elevadas, às quais serão submetidos durante a fase de impressão e difusão dos padrões de cera, revelando-se como tal o conhecimento das suas propriedades termodinâmicas um fator preponderante na escolha do substrato mais adequado. A Análise Térmica das amostras foi efetuada em atmosfera de ar e cadinhos de alumínio, no intervalo de temperaturas entre 20 °C e 550 °C e com uma taxa de aquecimento de 5 K/min. Todas as caracterizações térmicas foram efetuadas com o recurso ao equipamento STA 449 F3 Jupiter da NETZSCH (Figura 3.7).



**Figura 3.7:** Equipamento STA 449 F3 Jupiter da NETZSCH, utilizado na análise térmica dos substratos de papel por TG e DSC.

### 3.7.1. Termogravimetria

A Termogravimetria (TG – *Thermogravimetry*) é uma técnica termoanalítica que permite determinar a variação da massa de uma amostra de um dado material em função da temperatura ou do tempo (modo isotérmico), enquanto essa amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. É normalmente utilizada na determinação de certas características da amostra que apresentam perda ou ganho de massa devido a fenómenos de decomposição, oxidação, redução ou perda de compostos voláteis. A TG pode ser usada para avaliar a estabilidade térmica dos materiais, representando uma técnica particularmente útil no estudo de materiais poliméricos incluindo as fibras de celulose <sup>[101]</sup>.

A análise termogravimétrica é efetuada com o recurso a uma termobalança. Este aparelho é composto por uma microbalança eletrónica, um forno, um programador de temperatura e um instrumento para gravação dos dados produzidos por estes componentes.

### 3.7.2. Calorimetria Diferencial de Varrimento

A Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC – *Differential Scanning Calorimetry*) é uma técnica de análise térmica através da qual é possível medir a diferença entre a quantidade de calor necessária para aumentar a temperatura de uma amostra de um determinado material e de um material de referência em função da temperatura <sup>[102]</sup>.

Os calorímetros diferenciais de varrimento são constituídos por dois suportes: um para a amostra a analisar e outro para a referência (material termicamente inerte na gama de temperaturas em estudo). As amostras são continuamente aquecidas ou arrefecidas a uma velocidade constante e controlada em atmosfera inerte, redutora ou oxidante, sendo os resultados obtidos registados num gráfico do fluxo de calor entre a amostra e a referência em função da temperatura <sup>[103]</sup>.

A técnica de DSC permite assim identificar e quantificar variações como a temperatura de transição vítrea e a temperatura de início de degradação, as quais resultam em picos associados a fenómenos energéticos (endotérmicos ou exotérmicos) ocorridos durante o processo de variação de temperatura imposto à amostra <sup>[104]</sup>.

## 3.8. Ângulo de Contacto

O termo ângulo de contacto refere-se ao ângulo formado na interface de um sistema constituído por materiais com estados físicos diferentes, constituindo atualmente a técnica mais utilizada na determinação da capacidade de um material se molhar quando em contacto com um líquido (*wettability*) <sup>[105]</sup>.

A *wettability* de uma superfície depende do equilíbrio termodinâmico entre um sistema de três fases: sólido, líquido e gás. Assim sendo, o ângulo de contacto representa uma medida quantitativa do processo de *wettability*. Formalmente, o ângulo de contacto entre uma gota de um líquido com uma tensão superficial conhecida e uma superfície sólida depende do equilíbrio entre as forças de adesão, que permitem o espalhamento da gota do líquido sobre uma

superfície sólida e plana, e as forças de coesão do líquido, que permitem a contração da gota a uma esfera com uma superfície mínima. Se a gota for depositada sobre uma superfície plana, homogênea e perfeitamente nivelada, forma-se um ângulo de contacto de equilíbrio entre o líquido e a superfície sólida em qualquer ponto da linha de três fases, onde se encontram o sólido, o líquido e a fase gasosa <sup>[106, 107]</sup> **(Figura 3.8A)**.

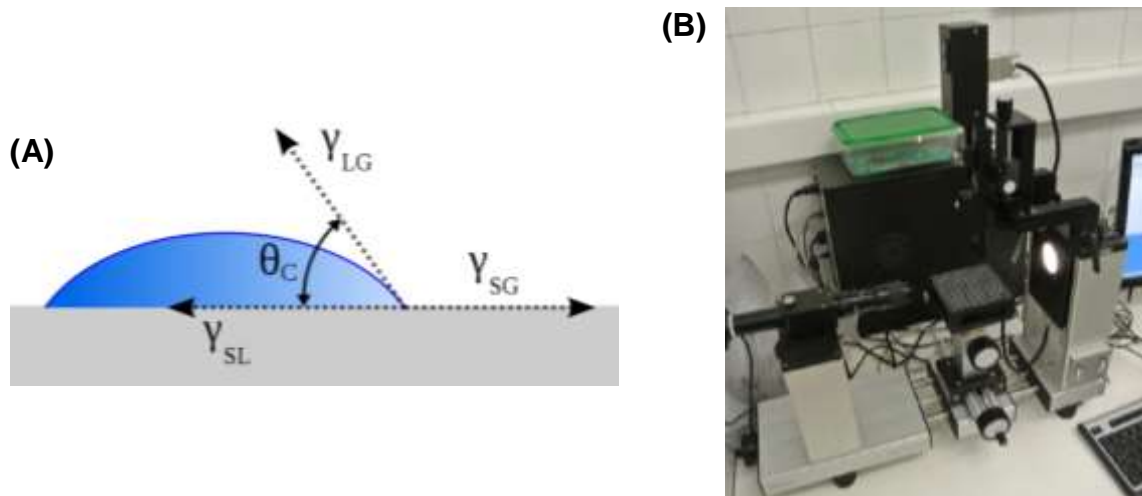
Considerando a gota em equilíbrio, a formulação clássica do balanço de forças na linha de contacto define o ângulo de contacto em função das densidades energéticas das três interfaces do sistema. Este balanço é descrito pela equação de Young:

$$\cos(\theta_c) = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LG}} \quad Eq. 3.2$$

onde  $\theta_c$  representa o ângulo de contacto e  $\gamma_{SG}$ ,  $\gamma_{SL}$  e  $\gamma_{LG}$  representam as tensões superficiais das interfaces sólido-gás, sólido-líquido e líquido-gás, respetivamente <sup>[107]</sup>.

A energia de superfície das fibras de celulose e do papel é um parâmetro que afeta o seu desempenho em termos de penetração de líquidos e adesão a outros materiais poliméricos, podendo a determinação deste parâmetro ser feita através de métodos que envolvem o ângulo de contacto, nomeadamente o método da gota séssil ou o método de Wilhelmy <sup>[105]</sup>.

No presente trabalho, as propriedades hidrofóbicas dos substratos de papel foram analisadas utilizando o equipamento OCA 20 da *DataPhysics* **(Figura 3.8B)**, com o qual é possível observar em tempo real a deposição do líquido (neste caso água destilada) sobre o substrato, permitindo a medição do ângulo de contacto no momento exato em que o líquido entra em contacto com o substrato. O *software* do equipamento calcula o ângulo de contacto de acordo com a equação de Young apresentada anteriormente, sendo que se o mesmo for superior a 90° o substrato é considerado hidrofóbico, uma vez que não se verifica uma boa adesão entre as superfícies dos materiais em contacto. Caso o ângulo encontrado seja inferior a 90° o substrato é hidrofílico, pois a adesão entre os materiais é favorecida.



**Figura 3.8:** **(A)** Esquema representativo da relação entre o ângulo de contacto e as tensões superficiais das diferentes interfaces do sistema <sup>[105]</sup>; **(B)** Equipamento OCA 20 da *DataPhysics*, utilizado na medição do ângulo de contacto dos substratos de papel.

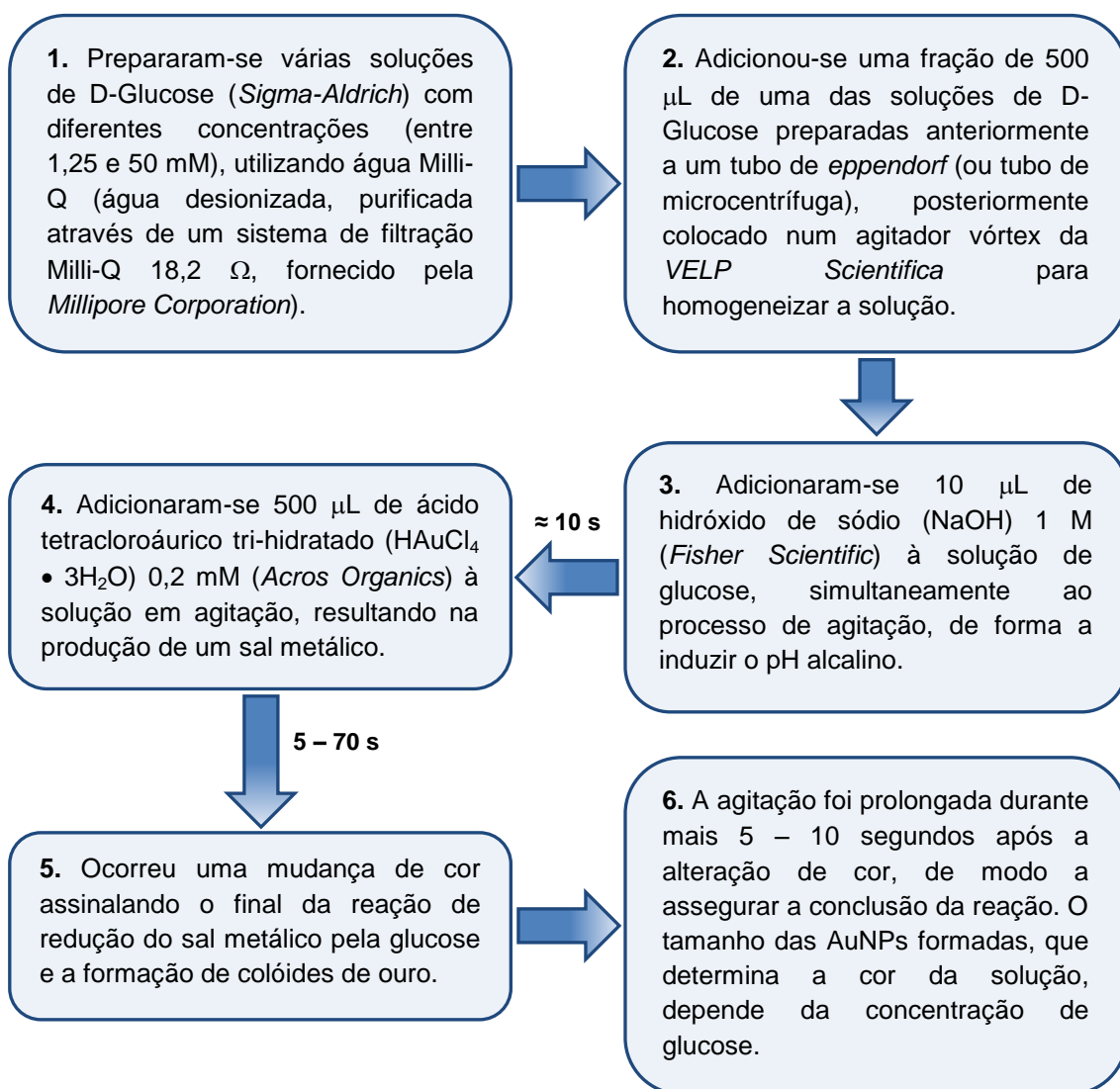
## Capítulo 4

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados e descritos todos os métodos e procedimentos experimentais, bem como os materiais utilizados durante a realização de cada uma das diferentes fases do trabalho desenvolvido.

#### 4.1. Síntese de AuNPs em solução por redução com a glucose

A síntese de AuNPs em solução, efetuada na fase inicial do presente trabalho, utilizando a glucose simultaneamente como agente de *capping* e de redução das AuNPs compreendeu um conjunto de etapas, as quais se encontram enumeradas no esquema da **Figura 4.1** <sup>[68]</sup>.



**Figura 4.1:** Esquema do procedimento experimental relativo ao processo de síntese de AuNPs em solução por redução com a glucose.

## 4.2. Testes colorimétricos em solução para medição de diferentes concentrações de glucose

Nesta fase, procedeu-se à realização de testes colorimétricos em solução, com o objetivo de analisar a resposta das AuNPs a diferentes concentrações de glucose. Para tal, repetiu-se todo o conjunto de procedimentos indicados em 4.1. para várias concentrações de glucose (1,25 – 50 mM), tendo-se obtido soluções de cores diferentes (na gama do vermelho até ao azul/roxo), dependendo da concentração de glucose e consequentemente do tamanho das AuNPs formadas.

### 4.2.1. Espectrofotometria de UV-Vis

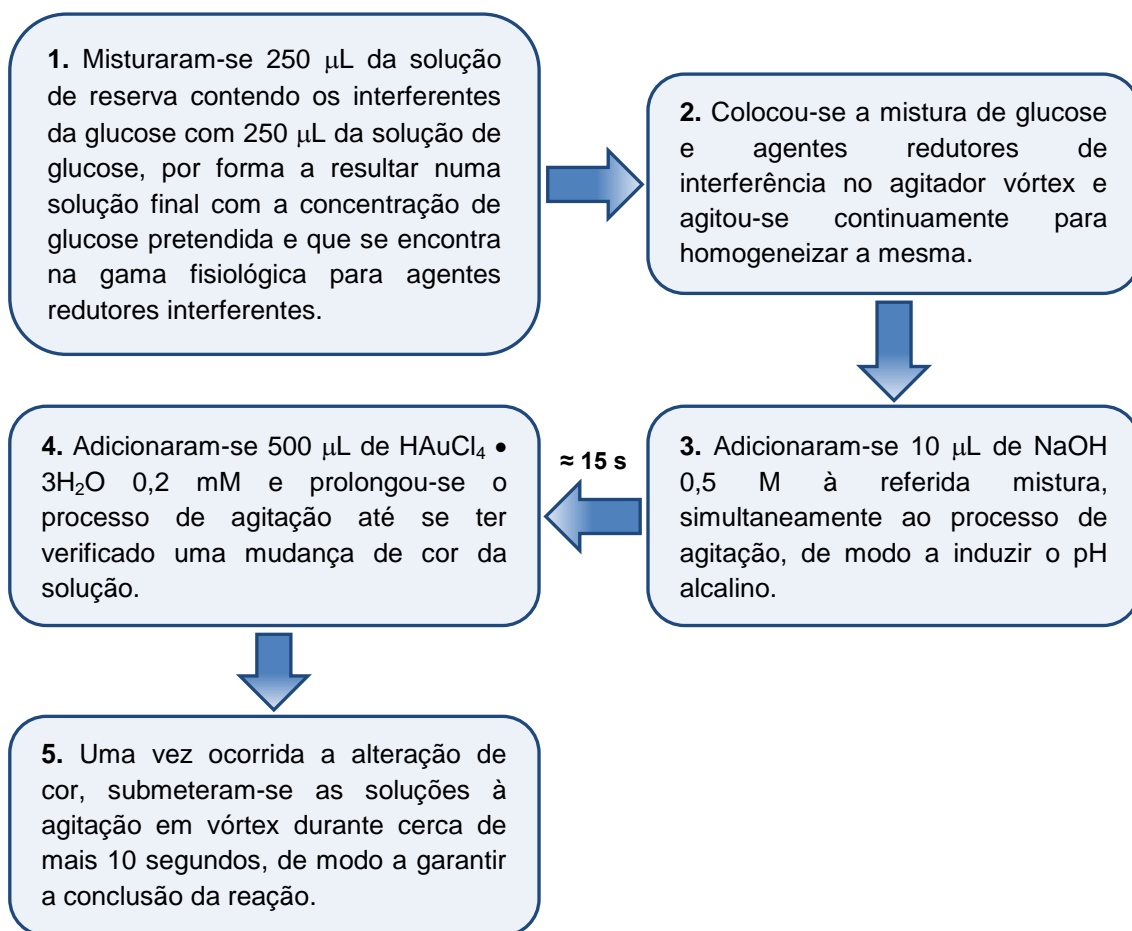
Os resultados obtidos anteriormente foram posteriormente analisados por espectrofotometria de UV-Vis, tal como descrito em 3.1., por forma a comparar os espectros de absorvância das diferentes soluções e a observar o deslocamento da banda SPR para as diferentes concentrações de glucose.

### 4.2.2. Influência de alguns interferentes da glucose

Para além da glucose, existem também outras moléculas redutoras presentes em amostras biológicas reais. No soro, essas moléculas redutoras são a frutose, a galactose, o ácido ascórbico, a glutatona e o ácido lipóico<sup>[68]</sup>.

Com o objetivo de testar *in vitro* a influência desses possíveis interferentes da glucose no processo de síntese de AuNPs em solução por redução com a glucose, foi preparada uma solução-mãe com o dobro da concentração fisiológica de cada um deles. Da mesma forma, também as soluções de glucose foram preparadas com o dobro das concentrações que se desejavam testar.

Em seguida, levou-se a cabo o procedimento experimental esquematizado na **Figura 4.2**<sup>[68]</sup>.



**Figura 4.2:** Esquema do procedimento experimental relativo ao estudo da influência dos interferentes da glucose no processo de síntese de AuNPs em solução.

#### 4.2.3. Reagente de Benedict

O reagente de Benedict é normalmente utilizado na deteção de glucose e de outros agentes redutores, particularmente em amostras de urina, onde a concentração de glucose é aproximadamente 10 vezes mais baixa do que a encontrada no sangue. Neste caso, utilizou-se o reagente de Benedict como termo de comparação com o método não enzimático de deteção de glucose apresentado anteriormente, de modo a avaliar e a comparar a sensibilidade de ambos os métodos.

O reagente de Benedict (*Sigma-Aldrich*) foi então testado com soluções de glucose de diferentes concentrações, adicionando 50 µL de cada uma dessas soluções a 500 µL do referido reagente. O tubo de *ependorf* com a mistura resultante foi depois introduzido em água a ferver durante cerca de 3 minutos, após os quais foi removido.

Os resultados obtidos foram posteriormente analisados visualmente e por espectrofotometria de UV-Vis, por forma a comparar os espectros de absorvância das diferentes soluções com os obtidos através do processo descrito anteriormente em 4.1.

### 4.3. Caracterização das AuNPs sintetizadas em solução

As AuNPs sintetizadas em solução foram observadas e caracterizadas utilizando duas técnicas de caracterização distintas: Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM) e Dispersão Dinâmica da Luz (DLS).

A TEM possibilitou a recolha de imagens de elevada resolução, permitindo obter informações no que diz respeito à morfologia e à forma das AuNPs formadas. Já a técnica de DLS permitiu efetuar uma avaliação mais rigorosa do diâmetro hidrodinâmico dessas mesmas AuNPs e do modo como este se relaciona com as diferentes concentrações de glucose utilizadas no processo de síntese.

### 4.4. Caracterização de diferentes tipos de substratos de papel

Com o objetivo de escolher o tipo de papel mais eficaz e mais adequado ao tipo de biossensor que se pretendia produzir, foi necessário proceder à caracterização de vários substratos de papel, recorrendo a diversas técnicas de caracterização, que se encontram apresentadas e descritas no **Capítulo 3** da presente dissertação.

Utilizaram-se três tipos de papel: papel Whatman nº1 (*GE Healthcare*), papel de fotocópia (*Portucel Soporcel*) e papel mata-borrão (*MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG*).

Já no que diz respeito às técnicas de caracterização, foram utilizadas:

- Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM), por forma a observar detalhadamente a morfologia superficial dos substratos de papel considerados;
- Espectroscopia Dispersiva de Raios-X (EDS), como técnica complementar à SEM, com o intuito de identificar os elementos químicos presentes nas amostras;
- Difração de Raios-X (DRX), de modo a identificar as diferentes estruturas cristalinas presentes nos substratos analisados;
- Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Espectroscopia Raman, com o propósito de obter informação acerca das ligações químicas e dos grupos funcionais presentes nas moléculas dos referidos substratos;
- Análise Térmica (TA), com o objetivo de avaliar as propriedades termodinâmicas dos diferentes tipos de papel e o comportamento dos mesmos quando expostos a temperaturas elevadas;
- Ângulo de Contacto, na determinação da capacidade de absorção de líquidos e das propriedades hidrofóbicas de cada um dos substratos.



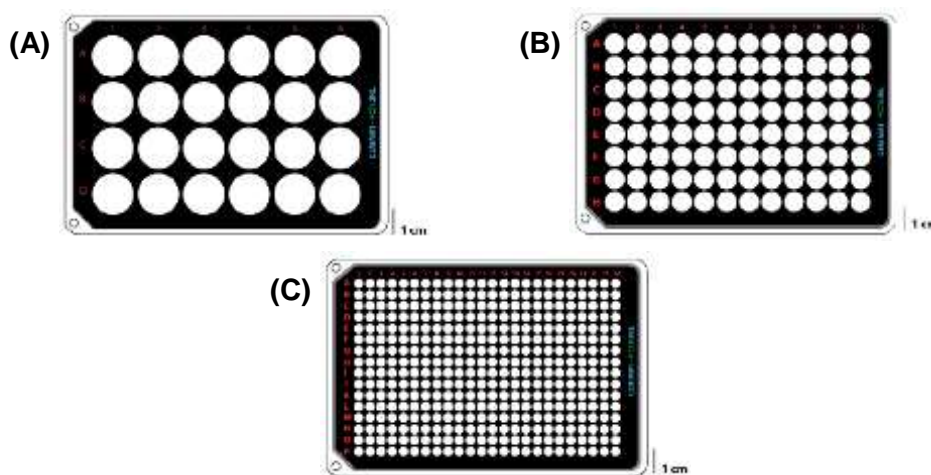
## 4.5. Construção dos sensores de papel para detecção de glucose

A construção dos sensores de papel foi efetuada com recurso à tecnologia *Lab-on-Paper*, a qual consiste basicamente na definição de zonas hidrofílicas no papel delimitadas por regiões hidrofóbicas.

O processo de fabricação dos dispositivos em papel compreendeu um conjunto de quatro etapas fundamentais enumeradas de seguida:

**1. Preparação dos substratos de papel:** tal como já foi referido anteriormente, foram utilizados três tipos de substratos de papel diferentes: papel Whatman nº1 (adquirido na forma de folhas de tamanho 570 x 460 mm), papel de fotocópia (adquirido na forma de folhas de tamanho 297 x 210 mm) e papel mata-borrão (adquirido na forma de folhas de tamanho 203 x 203 mm). Todos os substratos foram conservados em ambiente seco e sem qualquer tipo de tratamento adicional prévio à sua utilização, sendo apenas cortados em folhas de tamanho *standard A5* (210 x 148 mm).

**2. Desenho da geometria do sensor de papel e dos padrões de cera hidrofóbicos,** com recurso ao *Adobe Illustrator*, um *software* de desenho vetorial em computador. Foram produzidas microplacas de papel com 24, 96 e 384 poços, semelhantes às microplacas convencionais de plástico. Os poços foram desenhados com uma largura de linha de 0,5 mm e com uma distância entre si de 1 mm. Quanto às dimensões, a placa de 24 poços (**Figura 4.3A**) apresenta poços circulares com um diâmetro de 16 mm, a placa de 96 poços (**Figura 4.3B**) apresenta poços com um diâmetro de 7 mm e a placa de 384 poços (**Figura 4.3C**) apresenta poços com um diâmetro de 3,38 mm. As diferentes dimensões dos poços permitem proceder à otimização dos volumes de cada um dos reagentes utilizados na síntese de AuNPs.



**Figura 4.3:** Microplacas de papel com: (A) 24 poços; (B) 96 poços; (C) 384 poços.

**3. Impressão a cera dos padrões desenhados,** através de uma impressora *Xerox ColorQube 8570* (**Figura 4.4A**) usada para depositar camadas de material hidrofóbico sobre o substrato. Os reservatórios de tinta utilizados neste equipamento são constituídos por blocos de cera sólida *Xerox* (**Figura 4.4B**), que funde a baixas temperaturas. O calor aplicado pela impressora funde a cera, transferindo os padrões desenhados para a superfície do papel.



**Figura 4.4:** Material utilizado para a impressão dos padrões de cera: **(A)** impressora de cera sólida *Xerox ColorQube 8570*; **(B)** tinteiros de cera sólida *Xerox*.

**4. Difusão dos padrões de cera no papel**, com o recurso a uma placa térmica (**Figura 4.5**), que permite um aquecimento uniforme dos substratos de papel, difundindo dessa forma a cera impressa na sua superfície por toda a espessura do mesmo e criando consequentemente as barreiras hidrofóbicas pretendidas que vão delimitar as zonas hidrofílicas onde são depositadas as soluções aquosas dos vários reagentes. O aquecimento do papel foi feito a uma temperatura constante de 120 °C durante aproximadamente 1 minuto.



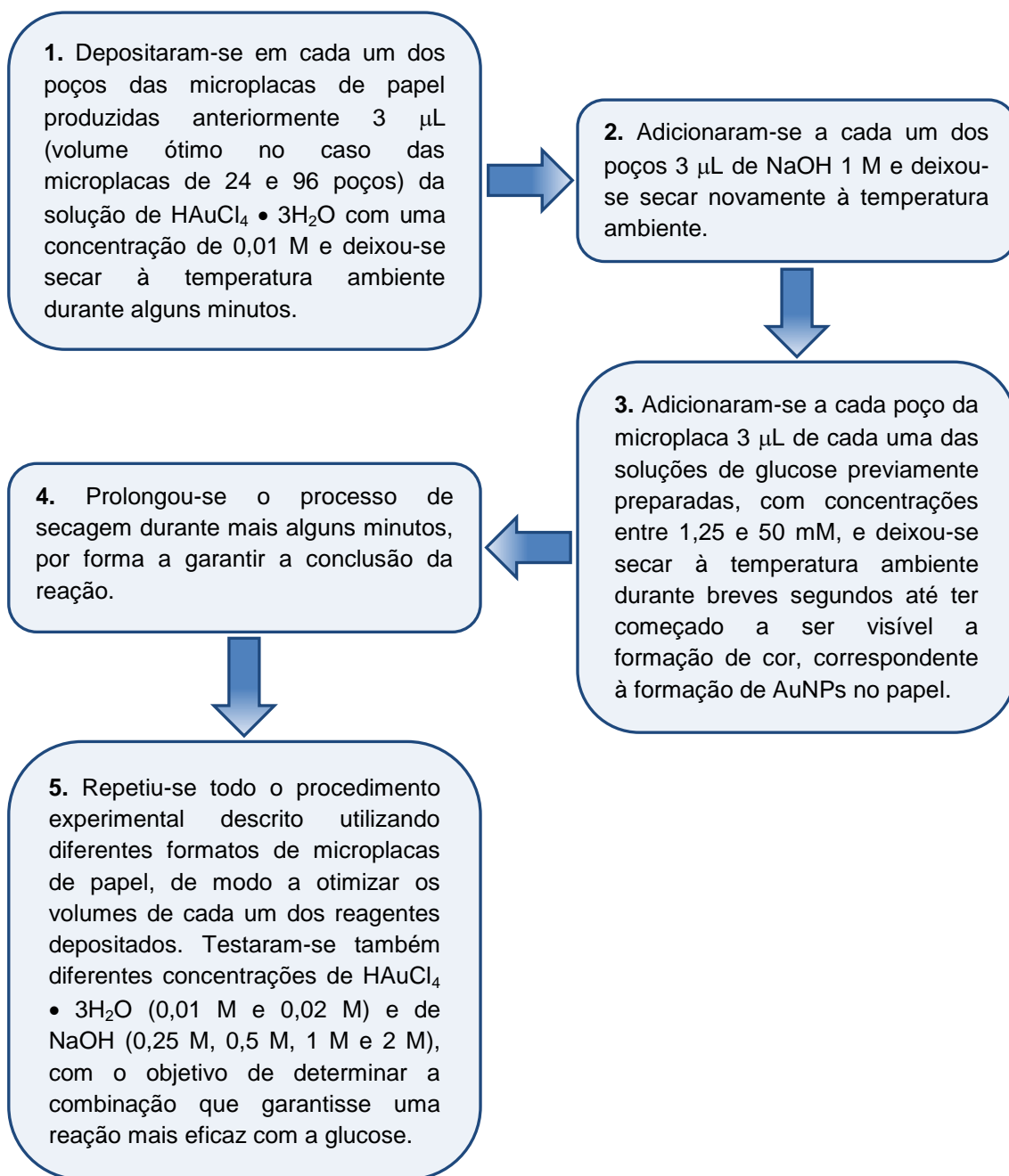
**Figura 4.5:** Placa térmica *SCHOTT ROBAX*, utilizada no processo de difusão dos padrões de cera no papel.

No final deste conjunto de etapas, os sensores de papel ficaram prontos para que fosse feita a deposição dos reagentes necessários ao desenvolvimento das reações colorimétricas associadas à determinação dos níveis de glucose.

#### 4.6. Síntese de AuNPs em papel por redução com a glucose

Nesta fase do trabalho, foi reproduzida em papel a síntese de AuNPs por redução com a glucose. Os reagentes utilizados foram exatamente os mesmos da síntese em solução descrita anteriormente em 4.1., embora os respetivos volumes e concentrações tenham sido ajustados neste caso. Para além disso, contrariamente à síntese em solução, a síntese em papel foi efetuada sem qualquer tipo de agitação.

As diferentes etapas do referido processo de síntese de AuNPs em papel são enumeradas de seguida no esquema da **Figura 4.6**:



**Figura 4.6:** Esquema do procedimento experimental relativo ao processo de síntese de AuNPs em papel por redução com a glucose.

#### 4.6.1. Espectrofotometria de UV/Vis

À semelhança do que foi mencionado em 4.2.1. para os testes colorimétricos em solução, os resultados obtidos no que diz respeito à síntese de AuNPs em papel utilizando diferentes concentrações de glucose foram também analisados por espectrofotometria de UV-Vis, com o objetivo de comparar os espectros de absorvância dos diferentes poços da microplaca de papel e de averiguar a existência ou não de deslocamento da banda SPR, analogamente ao observado no caso da síntese em solução.

#### 4.6.2. Análise Digital

A calibração é uma das etapas mais importantes do processo de fabricação de qualquer tipo de sensor. No caso do biossensor colorimétrico em questão, a sua calibração foi feita por análise digital, que consiste numa análise colorimétrica dos resultados.

Assim, por forma a avaliar a sensibilidade do ensaio colorimétrico em papel para determinação do nível de glucose, foi estudada a resposta colorimétrica do mesmo a diferentes concentrações de glucose. Os resultados obtidos foram digitalizados recorrendo a um digitalizador e posteriormente sujeitos a uma análise RGB (*Red Green Blue*) através do *software* de análise de imagem *ImageJ*. Esta análise permite obter as intensidades relativas de cada canal, que variam entre 0 e 255, sendo todas 0 quando a cor é preta e 255 quando a cor é branca. Foram então efetuadas medidas da intensidade dos canais RGB em cada poço da microplaca de papel (correspondente a uma determinada concentração de glucose), com base nas quais foram traçadas as retas de calibração necessárias para o correto funcionamento do sensor considerado.

#### 4.7. Caracterização das AuNPs sintetizadas em papel

Analogamente ao referido em 4.3. para as AuNPs sintetizadas em solução, também as AuNPs sintetizadas em papel foram observadas e caracterizadas com recurso a diferentes técnicas de caracterização.

Neste caso, foram utilizadas a Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM), a Espetroscopia Dispersiva de Raios-X (EDS), a Difração de Raios-X (DRX) e a Espetroscopia Raman, com o objetivo de confirmar a presença de AuNPs no papel e de obter informação morfológica, química e estrutural acerca das mesmas.

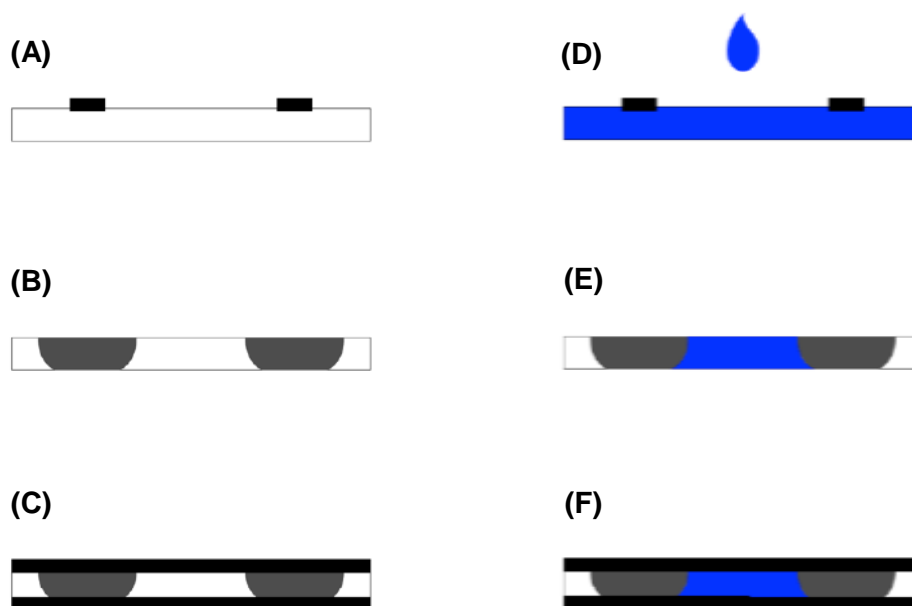
#### 4.8. Fabricação do dispositivo final

O processo de fabricação do dispositivo final para deteção e quantificação de glucose em amostras englobou essencialmente três etapas, as quais são enumeradas de seguida:

**1. Impressão da camada intermédia (poços) do sensor**, de acordo com o processo anteriormente descrito em 4.5.;

**2. Deposição dos reagentes** necessários à formação das reações colorimétricas pretendidas, e posterior **secagem** dos mesmos à temperatura ambiente;

**3. Impressão das camadas de encapsulamento**, utilizando a impressora *Xerox ColorQube 8570*, e **montagem do dispositivo final**. Uma vez concluído o processo de secagem, o papel foi novamente colocado na impressora para impressão da frente e do verso, de modo a encapsular os poços. Estas duas camadas não foram difundidas. A **Figura 4.7** ilustra aquilo que acontece na superfície do papel antes e depois da difusão da cera e depois do encapsulamento, quando é depositado um determinado volume de líquido.

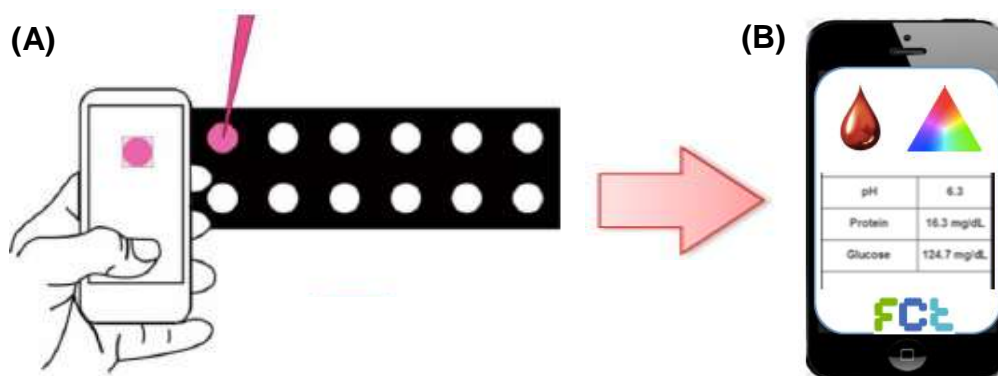


**Figura 4.7:** Representação esquemática das etapas de (A) impressão, (B) difusão da cera e (C) encapsulamento. Efeitos de cada etapa no confinamento do líquido (ilustrado a azul) no papel ((D), (E) e (F), respetivamente). Os blocos e linhas a preto representam a cera impressa e os blocos a cinzento a cera difundida. Adaptado de Costa <sup>[10]</sup>.

#### 4.8.1. Análise Digital

À semelhança do que foi referido em 4.6.2. para a avaliação da sensibilidade do ensaio colorimétrico e subsequente calibração do sensor de papel, também nesta fase foi efetuada uma análise digital do dispositivo final fabricado.

Os dispositivos foram testados com diferentes concentrações de glucose e sujeitos a uma análise RGB (*Red Green Blue*) através do *software* de análise de imagem *ImageJ*. Foi ainda estabelecida uma comparação entre a análise RGB dos resultados digitalizados recorrendo a um digitalizador e dos obtidos através de fotografia utilizando uma câmara de *smartphone* (Figura 4.8).



**Figura 4.8:** Esquema representativo do processo de (A) aquisição de imagens dos sensores colorimétricos, utilizando uma câmara de *smartphone* e (B) leitura e análise das imagens obtidas através de algoritmos computacionais, para posterior quantificação dos resultados.



## Capítulo 5

### 5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos no decorrer do presente trabalho, sendo igualmente efetuada a discussão dos mesmos.

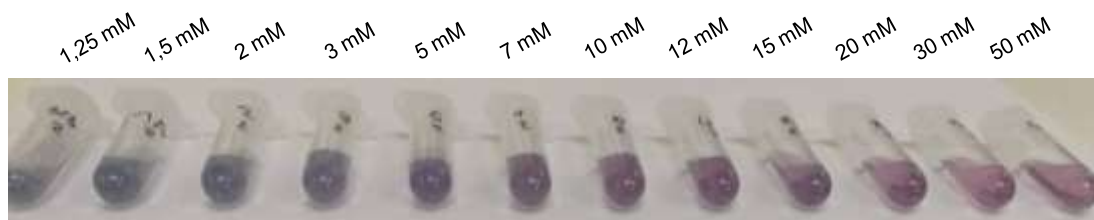
Em primeiro lugar, são apresentados os resultados correspondentes à síntese de AuNPs em solução por redução com a glucose, bem como a caracterização estrutural e morfológica das AuNPs sintetizadas. De seguida, apresenta-se a caracterização estrutural, morfológica, química e térmica dos diferentes substratos de papel testados e utilizados no desenvolvimento do sensor colorimétrico: papel Whatman nº1, papel de fotocópia e papel mata-borrão. São depois apresentados e analisados os resultados relativos à síntese de AuNPs em papel, assim como as otimizações e calibrações realizadas e a caracterização estrutural, morfológica e química das referidas NPs, efetuada com o recurso a técnicas complementares, nomeadamente SEM, EDS, DRX e Espetroscopia Raman. É também estabelecida uma comparação entre a síntese em solução e a síntese em papel.

Por último, são apresentados e discutidos os resultados da análise digital colorimétrica efetuada, estabelecendo-se uma comparação entre os resultados digitalizados recorrendo a um digitalizador e os obtidos através de fotografia utilizando uma câmara de *smartphone*.

#### 5.1. Síntese de AuNPs em solução por redução com a glucose

A síntese de AuNPs em solução, efetuada na fase inicial do presente trabalho, foi realizada utilizando a glucose simultaneamente como agente redutor e de *capping* das NPs. Por um lado, o grupo aldeído da molécula de glucose reduz o ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) de um estado de oxidação de  $\text{Au}^{3+}$  para  $\text{Au}^0$ , o que resulta na formação de sementes de AuNPs em solução. Pesquisas adicionais indicaram que o ouro reduzido não é estável sob a forma de AuNPs em solução devido à grande dificuldade de estabilização das mesmas em meio ácido. Por outro lado, a referida síntese é favorecida na presença de um meio alcalino, pelo que foi utilizada neste caso uma solução de NaOH de forma a garantir a existência das condições alcalinas favoráveis ao desenvolvimento da reação pretendida [68, 108]. Para além disso, a glucose funciona neste caso como estabilizador das AuNPs ligando-se à superfície das mesmas e formando uma espécie de revestimento que cobre as NPs impedindo que elas se agreguem (*capping*).

Foram testadas diferentes concentrações de glucose (1,25 – 50 mM) de modo a avaliar a sua influência na reação, tendo sido registadas alterações a vários níveis. No que diz respeito às alterações de cor da solução, os resultados obtidos podem ser facilmente analisados através de uma inspeção visual (**Figura 5.1**).



**Figura 5.1:** Diferenças colorimétricas observadas em soluções contendo AuNPs sintetizadas por redução com a glucose, utilizando diferentes concentrações do agente redutor.

Tal como é possível observar através da **Figura 5.1**, são de facto evidentes as mudanças de cor das soluções de AuNPs. Para concentrações mais baixas de glucose as soluções apresentam uma cor azul/púrpura, ao passo que para concentrações mais altas de glucose as soluções adquirem uma cor rosa/avermelhada. Estas alterações de cor estão relacionadas com o tamanho das AuNPs formadas em solução: a cor azul está associada a NPs de maiores dimensões, enquanto que partículas mais pequenas dizem respeito à presença da cor avermelhada.

É ainda importante referir que se tentou reproduzir esta síntese de AuNPs em solução utilizando concentrações de glucose inferiores a 1,25 mM, embora nesses casos não tenha sido possível observar qualquer formação de cor nas soluções, pelo que se pode concluir que o limite de deteção deste ensaio colorimétrico se encontra próximo de uma concentração de glucose de 1,25 mM. Este baixo limite de deteção é significativo para testar situações de hipoglicemia (concentrações de glucose inferiores a 50 mg/dL, ou seja, 2,8 mM), uma condição comum que em casos extremos pode levar ao coma ou até mesmo à morte.

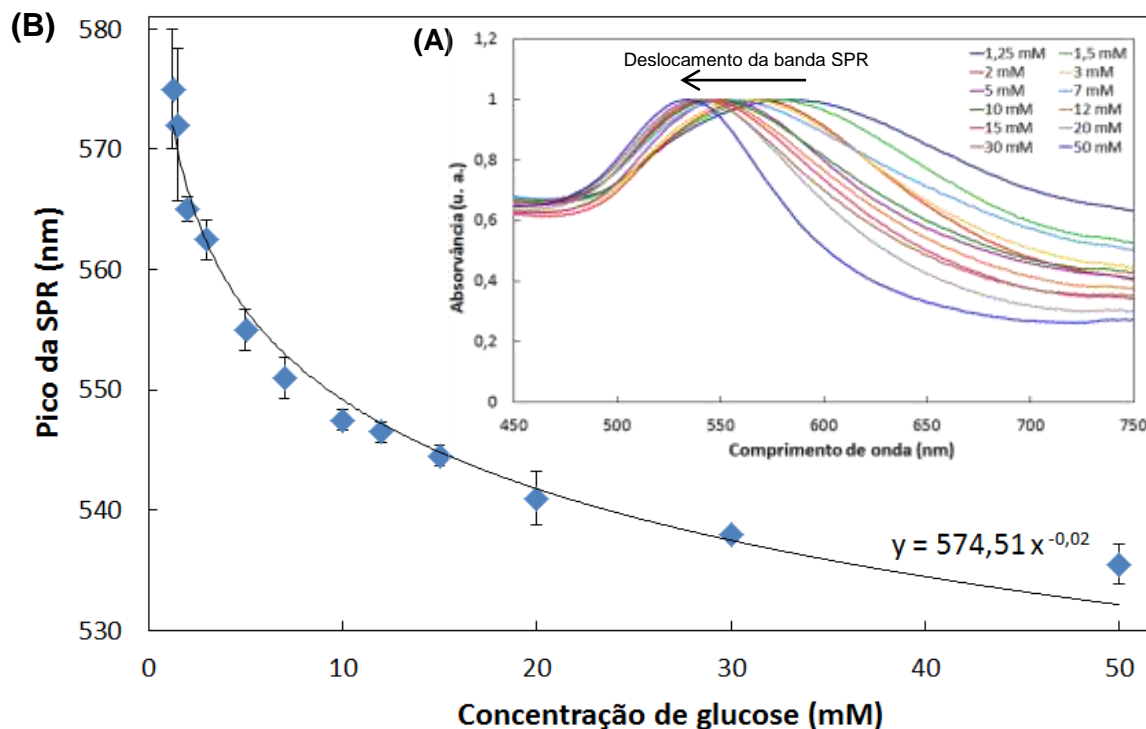
### 5.1.1. Espectrofotometria de UV-Vis

Os resultados colorimétricos obtidos foram posteriormente analisados por espectrofotometria de UV-Vis, de modo a comparar os espectros de absorvância das diferentes soluções e a observar o deslocamento da banda SPR para as diferentes concentrações de glucose testadas.

Foram utilizadas microplacas em poliestireno com 96 poços, transparentes e com fundo plano, tendo sido depositados em cada poço 200  $\mu$ L de cada uma das soluções de AuNPs a analisar. As leituras foram efetuadas na gama de comprimentos de onda entre 450 e 750 nm, correspondente à região visível do espectro eletromagnético. As curvas UV-Vis obtidas foram posteriormente normalizadas de forma a facilitar a sua interpretação e comparação. Os espectros de absorvância normalizados das diferentes soluções encontram-se apresentados no gráfico da **Figura 5.2A**.

Já o gráfico da **Figura 5.2B** mostra as alterações registadas no pico da banda SPR, em função da concentração de glucose utilizada na síntese de AuNPs. Foram efetuadas seis repetições da referida síntese em solução para cada uma das doze concentrações de glucose testadas, obtendo-se os respetivos espectros de absorvância por espectrofotometria de UV-Vis, à semelhança daquilo que já foi descrito anteriormente. Valores médios e desvios-padrão foram posteriormente calculados e utilizados na construção do gráfico apresentado.



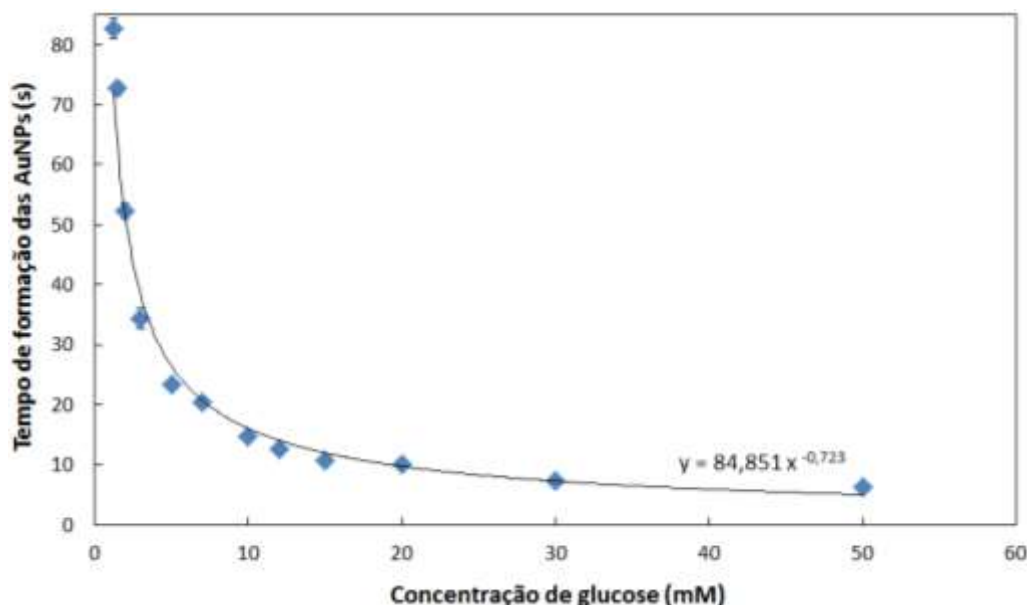


**Figura 5.2:** (A) Espetros de absorvância normalizados das diferentes soluções de AuNPs e respetivo deslocamento da banda SPR; (B) Alterações no pico da banda SPR, registadas em função da concentração de glucose utilizada na síntese das AuNPs.

Através do gráfico da **Figura 5.2A** é facilmente observável um deslocamento da banda SPR para comprimentos de onda mais pequenos à medida que se aumenta a concentração de glucose utilizada na síntese das AuNPs. Para a concentração mais baixa de glucose (1,25 mM) o pico da ressonância plasmónica de superfície situa-se um pouco acima dos 580 nm, enquanto que a concentração mais elevada de glucose (50 mM) regista um pico próximo dos 530 nm. Este deslocamento da banda SPR está evidentemente relacionado com a mudança de cor das soluções que por sua vez se relaciona com o tamanho das AuNPs formadas.

Para além disso, a análise do gráfico da **Figura 5.2B** permite constatar que as alterações mais significativas ocorrem para as concentrações mais baixas de glucose (até 10 mM). Por outro lado, acima de 20 mM as variações na banda SPR são praticamente inexistentes, o que revela um comportamento de "saturação" em concentrações mais elevadas de glucose que pode ser justificado pelo facto da glucose estar a cobrir cada vez mais a superfície das AuNPs sintetizadas em solução. Uma vez formadas as NPs, existe uma quantidade finita de superfície disponível para ser coberta, sendo que para as concentrações de glucose acima de 20 mM o excesso de glucose vai deixando de ser capaz de interagir diretamente com as superfícies das NPs, o que faz com que as alterações no tamanho ou na forma das mesmas e consequentemente as variações na banda SPR sejam cada vez mais desprezáveis <sup>[68]</sup>.

O gráfico da **Figura 5.3** registra o tempo de formação das AuNPs em solução, em função da concentração de glucose utilizada na síntese, permitindo aferir a cinética da reação. Os dados foram obtidos com base em três repetições da referida síntese e no posterior cálculo dos valores médios e desvios-padrão.



**Figura 5.3:** Tempo de formação das AuNPs em solução, em função da concentração de glucose utilizada na síntese.

Os resultados apresentados mostram uma clara tendência de que à medida que a concentração de glucose aumenta a formação de NPs ocorre muito mais rapidamente, tornando-se praticamente instantânea para concentrações mais elevadas. O tempo que as soluções demoram a mudar de cor varia entre os 83 segundos para a concentração mais baixa e os 6 segundos para a concentração mais alta de glucose. Para além disso, é possível verificar que para concentrações superiores a 15 mM o tempo de formação das AuNPs deixa de apresentar variações significativas, o que indica que a glucose presente em excesso não desempenha um papel direto na formação de NPs.

Este é assim outro método útil para a quantificação dos níveis de glucose em amostras: a formação de NPs mais lenta (superior a  $\approx 20$  segundos) está associada a níveis saudáveis de glucose no sangue, enquanto a formação de NPs mais rápida (inferior a  $\approx 20$  segundos) é atribuída a elevados níveis de glucose no sangue.

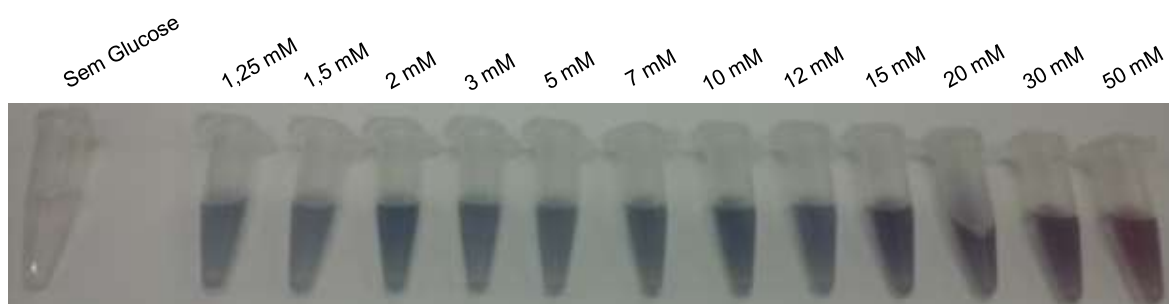
A **Tabela 0.1**, apresentada no **Anexo I**, permite complementar os gráficos das **Figuras 5.2B e 5.3**, estabelecendo uma comparação entre o deslocamento da banda SPR e o tempo de formação das AuNPs para as diferentes concentrações de glucose testadas. Analisando a referida tabela e os dois gráficos anteriores, verifica-se que a tendência observada na evolução do pico da banda SPR é muito semelhante à registada no tempo de formação das AuNPs. Ambos os parâmetros registam claramente variações mais acentuadas ao longo das concentrações mais baixas de glucose, apresentando alterações cada vez menos significativas à medida que se aumenta a concentração e que a superfície das NPs atinge uma situação de “saturação” com a glucose.

### 5.1.2. Influência de alguns interferentes da glucose

Embora tenha ficado demonstrada a capacidade da glucose reduzir o ácido tetracloreáurico e formar AuNPs em solução, existem também outras moléculas redutoras presentes no soro, nomeadamente a frutose, a galactose, o ácido ascórbico, a glutatona e o ácido lipóico<sup>[68]</sup>.

De forma a testar a influência desses possíveis interferentes no processo de síntese e nos ensaios colorimétricos levados a cabo, a formação de NPs foi observada em soluções contendo diferentes concentrações de glucose, para além de concentrações fisiológicas de cada uma das seis moléculas acima mencionadas.

A **Figura 5.4** apresenta os resultados obtidos no que diz respeito aos testes colorimétricos efetuados utilizando diferentes concentrações de glucose e simultaneamente na presença dos referidos interferentes da glucose.

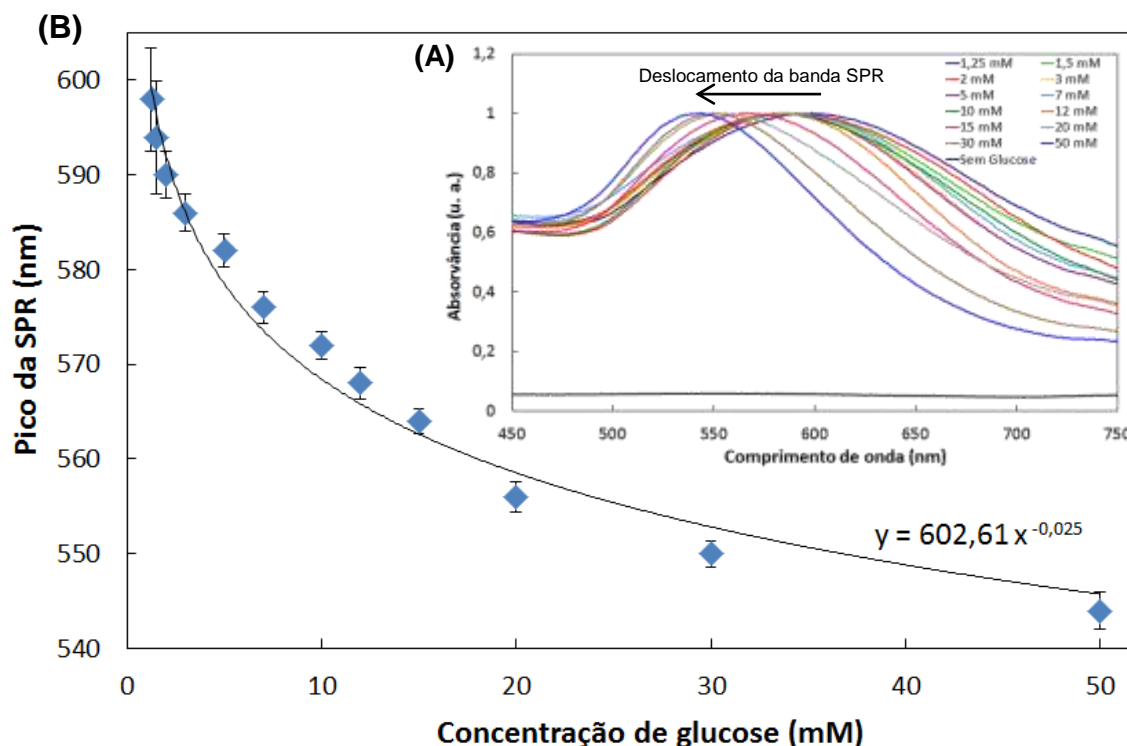


**Figura 5.4:** Diferenças colorimétricas observadas em soluções de AuNPs sintetizadas por redução com diferentes concentrações de glucose e na presença de outras moléculas redutoras, de forma a estudar a sua influência na síntese.

Observando a **Figura 5.4** pode concluir-se que os interferentes testados não têm qualquer influência na síntese de AuNPs, uma vez que as alterações de cor das soluções de sal de ouro são semelhantes quer a reação ocorra apenas na presença da glucose (ver **Figura 5.1**) ou na presença da glucose e dos seus interferentes: para concentrações mais baixas de glucose as soluções apresentam uma cor azul/púrpura, adquirindo uma cor rosa/avermelhada à medida que se atingem concentrações mais elevadas. Tal como já foi referido anteriormente, as mudanças de cor ocorridas estão relacionadas com a alteração do tamanho das AuNPs formadas.

Para além disso, foi também testado se a mistura de interferentes por si só (sem glucose) seria capaz de provocar algum tipo de alteração colorimétrica na solução de  $\text{HAuCl}_4$ , no entanto não se verificou qualquer mudança de cor tendo a solução permanecido incolor, o que permite concluir que a reação só acontece na presença da glucose.

Os resultados colorimétricos obtidos foram analisados por espectrofotometria de UV-Vis, de modo a comparar os espectros de absorvância das diferentes soluções e a observar o deslocamento da banda SPR para as diferentes concentrações de glucose testadas. Os espectros de absorvância normalizados das diferentes soluções e as alterações no pico da banda SPR encontram-se apresentados nos gráficos das **Figuras 5.5A** e **5.5B** respetivamente.



**Figura 5.5:** (A) Espectros de absorvância normalizados das diferentes soluções de AuNPs e respetivo deslocamento da banda SPR, sendo possível constatar também a não influência dos interferentes da glucose na síntese; (B) Alterações no pico da banda SPR, registadas em função da concentração de glucose utilizada na síntese das AuNPs.

Analogamente ao apresentado nos gráficos da **Figura 5.2**, onde não foi estudada a influência de qualquer interferente da glucose, também neste caso é possível observar um deslocamento da banda SPR para comprimentos de onda mais pequenos à medida que se aumenta a concentração de glucose utilizada na síntese das AuNPs. Os picos da banda SPR variam neste caso entre os 598 nm para a concentração mais baixa de glucose (1,25 mM) e os 544 nm para a concentração mais elevada (50 mM).

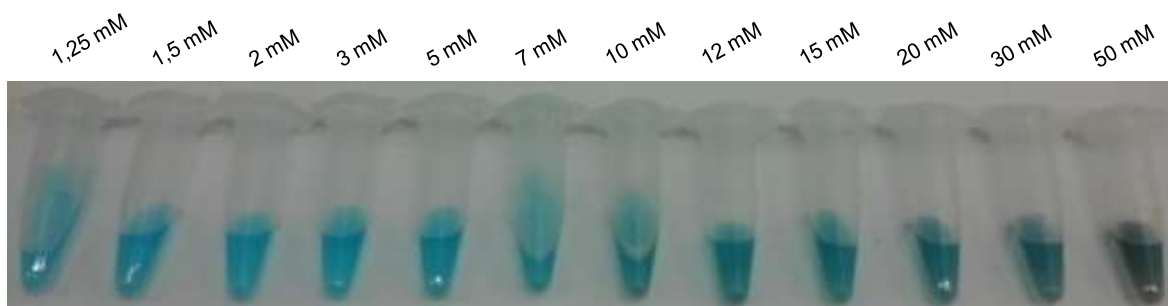
O espectro de absorvância correspondente à amostra sem glucose permite também confirmar a não influência dos interferentes da glucose na síntese, uma vez que o mesmo não apresenta qualquer pico de absorvância, o que significa que sem a presença de glucose não ocorre formação de AuNPs.

### 5.1.3. Reagente de Benedict

Com o objetivo de avaliar e comparar diferentes métodos de deteção de glucose, utilizou-se o reagente de Benedict, normalmente usado na deteção não só de glucose mas também de outros agentes redutores.

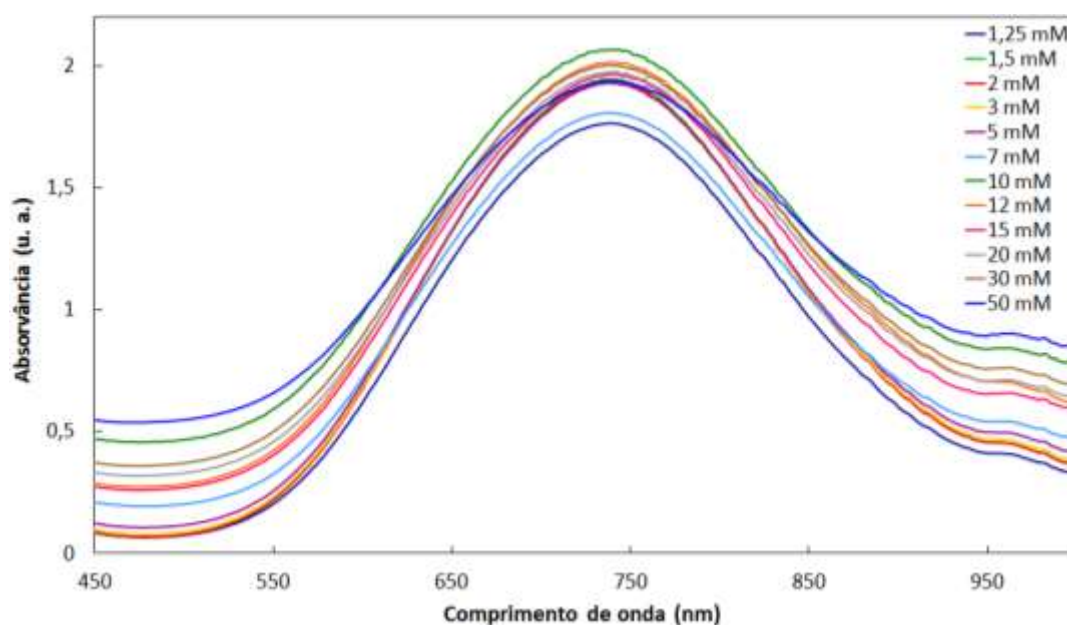
Os resultados relativos aos testes colorimétricos efetuados na presença deste reagente de cor azul encontram-se apresentados na **Figura 5.6**. A sua análise permite afirmar que o reagente de Benedict parece ser significativamente menos sensível para soluções com concentrações mais baixas de glucose, uma vez que nestas as alterações de cor são praticamente inexistentes. É possível observar uma ligeira alteração de cor a partir apenas dos

10 mM, o que reflete uma dificuldade de aplicação do método em questão na gama de valores ditos normais no que diz respeito à concentração de glucose no sangue. Para além disso, é ainda possível constatar que este método apresenta menor sensibilidade na deteção de glucose quando comparado com o método não enzimático testado e analisado anteriormente.



**Figura 5.6:** Diferenças colorimétricas observadas em soluções de glucose com diferentes concentrações, após reação com o reagente de Benedict.

De forma a complementar a inspeção visual efetuada, as soluções acima foram também analisadas por espectrofotometria de UV-Vis. Os espectros obtidos, que neste caso não foram normalizados de modo a facilitar a análise dos mesmos, encontram-se presentes no gráfico da **Figura 5.7**, mostrando de facto a existência de um pico de absorvância próximo dos 740 nm. Contudo, neste caso esse pico não apresenta oscilações significativas na gama selecionada de comprimentos de onda (450 – 1000 nm) em função da concentração de glucose utilizada, mantendo-se praticamente estável, o que faz com que este método se revele insuficiente e pouco eficaz na comparação de amostras com diferentes concentrações de glucose.



**Figura 5.7:** Espectros de absorvância não normalizados das diferentes soluções de glucose após reação com o reagente de Benedict. O pico de absorvância mantém-se estável, não sendo observados deslocamentos consideráveis da curva UV-Vis em função da concentração de glucose utilizada.

## 5.2. Caracterização das AuNPs sintetizadas em solução

As AuNPs formadas em solução por redução do ácido tetracloroáurico com a glucose foram observadas e caracterizadas utilizando duas técnicas de caracterização distintas: a Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e a Dispersão Dinâmica da Luz (DLS).

Os resultados relativos a cada uma destas técnicas são apresentados de seguida.

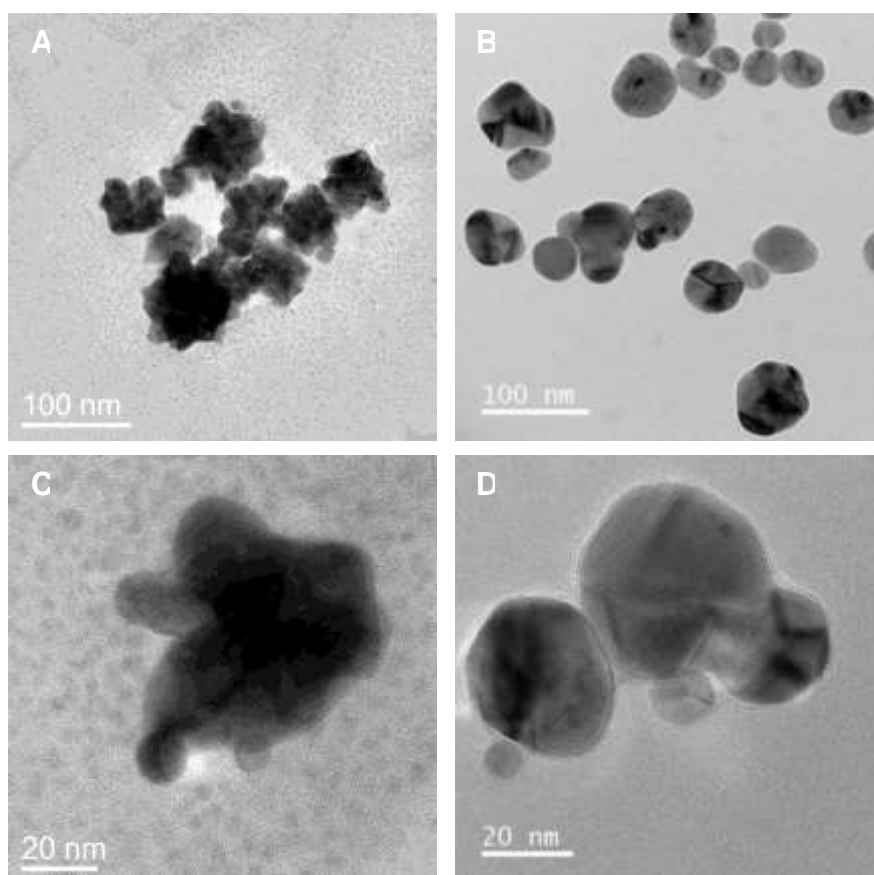
### 5.2.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão

A TEM tornou possível a recolha de imagens de elevada resolução, permitindo obter informações no que diz respeito à morfologia e à forma das AuNPs produzidas.

Relativamente à preparação das amostras, foi utilizado como suporte uma grelha de cobre coberta por um filme fino de carbono, o qual se caracteriza pela sua transparência e resistência ao feixe de eletrões. O filme de carbono foi então mergulhado na solução contendo as AuNPs sintetizadas e deixado a secar à temperatura ambiente durante alguns minutos, sendo depois colocado sobre a grelha de cobre para posterior análise no TEM.

Foram obtidas imagens de AuNPs sintetizadas usando três concentrações diferentes de glucose: uma concentração baixa (1,25 mM), uma concentração intermédia (10 mM) e uma concentração elevada (50 mM).

A **Figura 5.8** apresenta imagens de TEM com diferentes ampliações das AuNPs sintetizadas utilizando uma concentração de glucose de 1,25 mM.



**Figura 5.8:** Imagens de TEM da amostra de AuNPs sintetizadas utilizando uma concentração de glucose de 1,25 mM. As imagens exibidas apresentam diferentes níveis de ampliação.

Analisando as imagens, é possível verificar que as AuNPs apresentam formas por vezes bastante irregulares e assimétricas (**Figuras 5.8A e 5.8C**), embora possam ser encontradas AuNPs com uma configuração aproximadamente esférica (**Figuras 5.8B e 5.8D**).

As AuNPs obtidas neste caso possuem um diâmetro médio entre 50 e 100 nm. Para além disso, nas imagens relativas às AuNPs com uma forma mais esférica é possível observar que as mesmas se encontram cobertas por uma espécie de capa de carbono. Isto resulta do facto da glucose funcionar simultaneamente como agente de *capping*, revestindo dessa forma as AuNPs e impedindo que elas se agreguem.

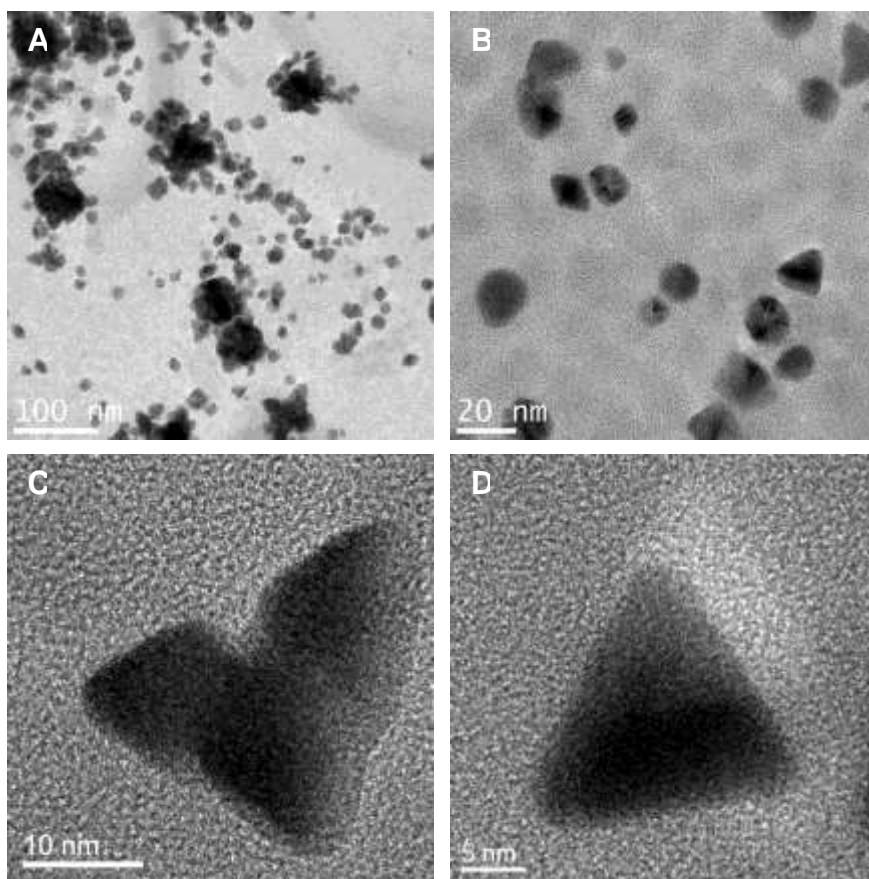
Foi também efetuada uma análise química das AuNPs formadas. O espectro obtido encontra-se apresentado na **Figura 5.9** e nele podem observar-se claramente três picos (2,2 keV, 9,7 keV e 11,5 keV) correspondentes à existência de ouro na amostra. Verifica-se ainda a existência na grelha de TEM de uma grande quantidade de impurezas, as quais podem advir de eventuais contaminações com restos da solução de sal de ouro.



**Figura 5.9:** Espectro EDS da amostra de AuNPs sintetizadas utilizando uma concentração de glucose de 1,25 mM e identificação dos picos característicos.



Na **Figura 5.10** encontram-se reunidas imagens de TEM com diferentes ampliações das AuNPs sintetizadas utilizando uma concentração de glucose de 10 mM.

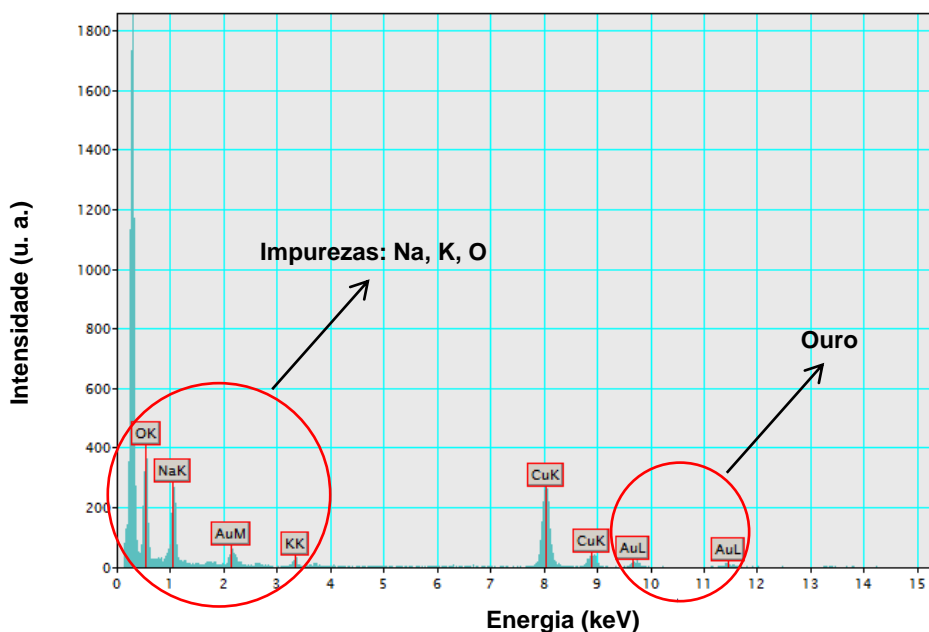


**Figura 5.10:** Imagens de TEM da amostra de AuNPs sintetizadas utilizando uma concentração de glucose de 10 mM. As imagens exibidas apresentam diferentes níveis de ampliação.

Observando as imagens, pode constatar-se que as AuNPs continuam a apresentar formas bastante diversas ainda que seja visível uma maior regularidade e simetria. É possível encontrar AuNPs com uma forma aproximadamente circular, triangular (**Figuras 5.10C e 5.10D**), quadrada e pentagonal. A **Figura 5.10A** mostra ainda a existência de alguns aglomerados de NPs resultantes da agregação das mesmas. No que diz respeito ao tamanho, e tal como era expectável, as AuNPs obtidas são consideravelmente mais pequenas em comparação com as da **Figura 5.8**, apresentando um diâmetro médio entre 5 e 20 nm.

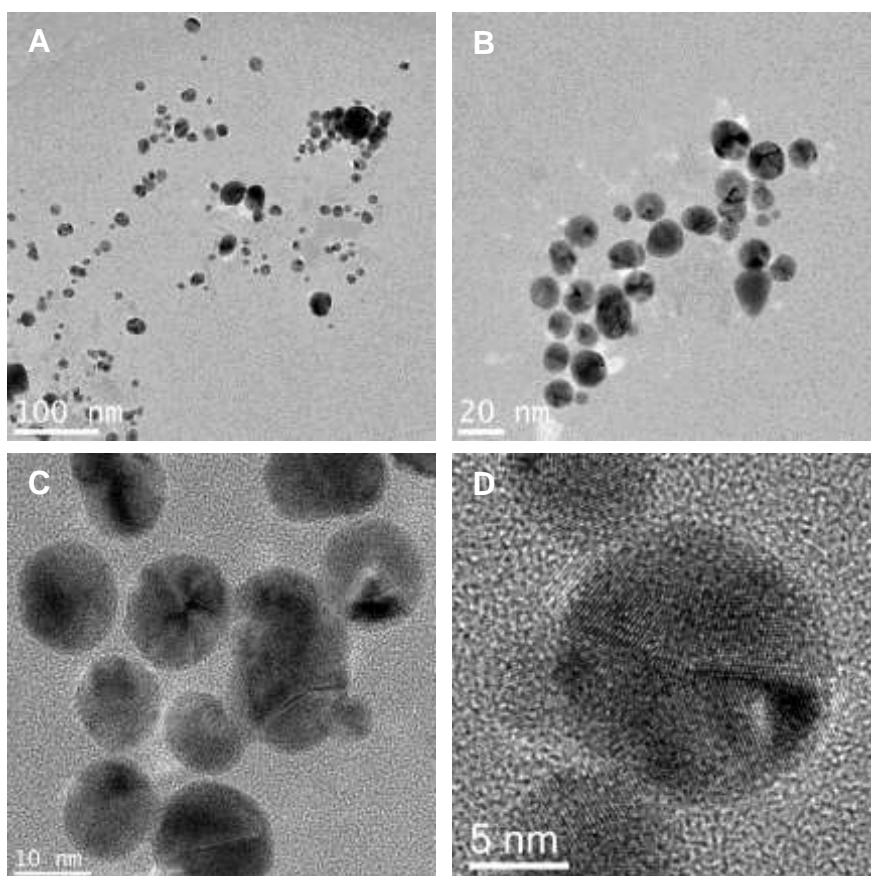
O espectro EDS relativo às AuNPs da **Figura 5.10** está apresentado na **Figura 5.11**. Continuam a ser detetados, ainda que com uma menor intensidade, os três picos (2,2 keV, 9,7 keV e 11,5 keV) correspondentes à presença de ouro na amostra, sendo também registada a presença de impurezas na amostra, embora em menor quantidade do que na anterior.





**Figura 5.11:** Espectro EDS da amostra de AuNPs sintetizadas utilizando uma concentração de glucose de 10 mM e identificação dos picos característicos.

A **Figura 5.12** mostra imagens de TEM com diferentes ampliações das AuNPs sintetizadas utilizando uma concentração de glucose de 50 mM.



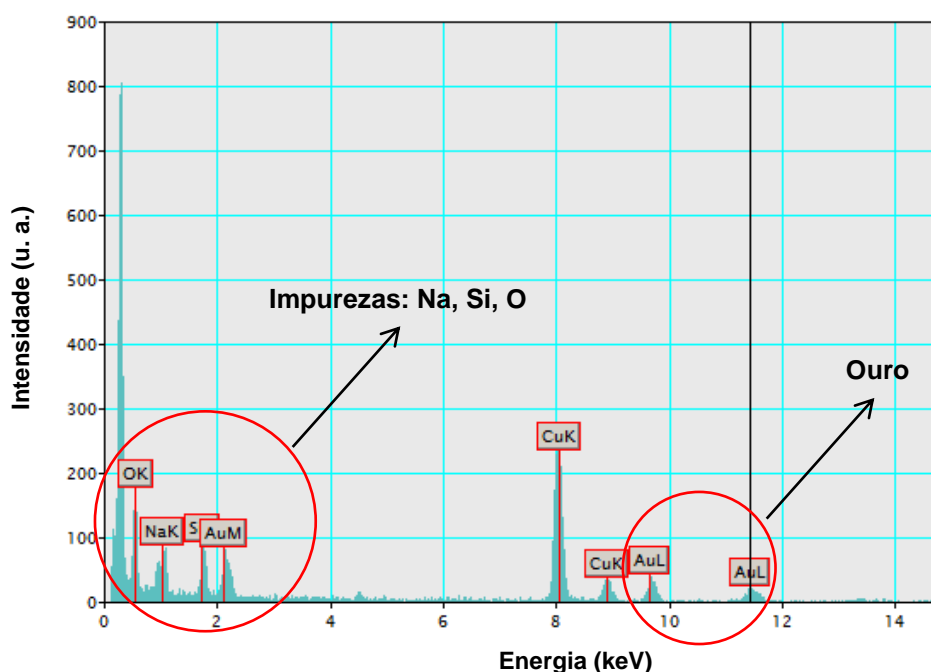
**Figura 5.12:** Imagens de TEM da amostra de AuNPs sintetizadas utilizando uma concentração de glucose de 50 mM. As imagens exibidas apresentam diferentes níveis de ampliação.

Estas AuNPs aparentam ser bastante homogêneas, apresentando na sua maioria uma forma aproximadamente circular e um diâmetro médio entre 3 e 20 nm.

As **Figuras 5.8, 5.10 e 5.12** permitem então concluir que de uma forma geral e tal como era esperado as dimensões das AuNPs sintetizadas diminuem à medida que se aumenta a concentração do agente redutor. As maiores AuNPs, formadas a concentrações mais baixas de glucose, são ao que tudo indica o resultado de um mecanismo cinético de agregação, uma vez que a quantidade de glucose envolvida na síntese é insuficiente para cobrir toda a superfície das NPs, aumentando a probabilidade destas se agregarem. Por outro lado, uma maior quantidade de glucose, capaz de revestir totalmente a superfície das NPs, vai dificultar o processo de agregação, resultando em NPs de menores dimensões. O *capping* efetuado pela glucose é assim um fator preponderante no tamanho das AuNPs formadas. Para além disso, concentrações mais elevadas de glucose resultam na formação de NPs com uma simetria e uma homogeneidade cada vez maiores.

É ainda possível correlacionar a diferença de tamanho entre as NPs em diferentes concentrações de glucose com as alterações observadas na posição e na forma da banda plasmónica de superfície, relatadas anteriormente.

Relativamente à análise química, a **Figura 5.13** apresenta o espectro correspondente às AuNPs da **Figura 5.12**, no qual é possível observar mais uma vez os três picos característicos da presença de ouro na amostra, bem como os picos associados à existência de impurezas na mesma.



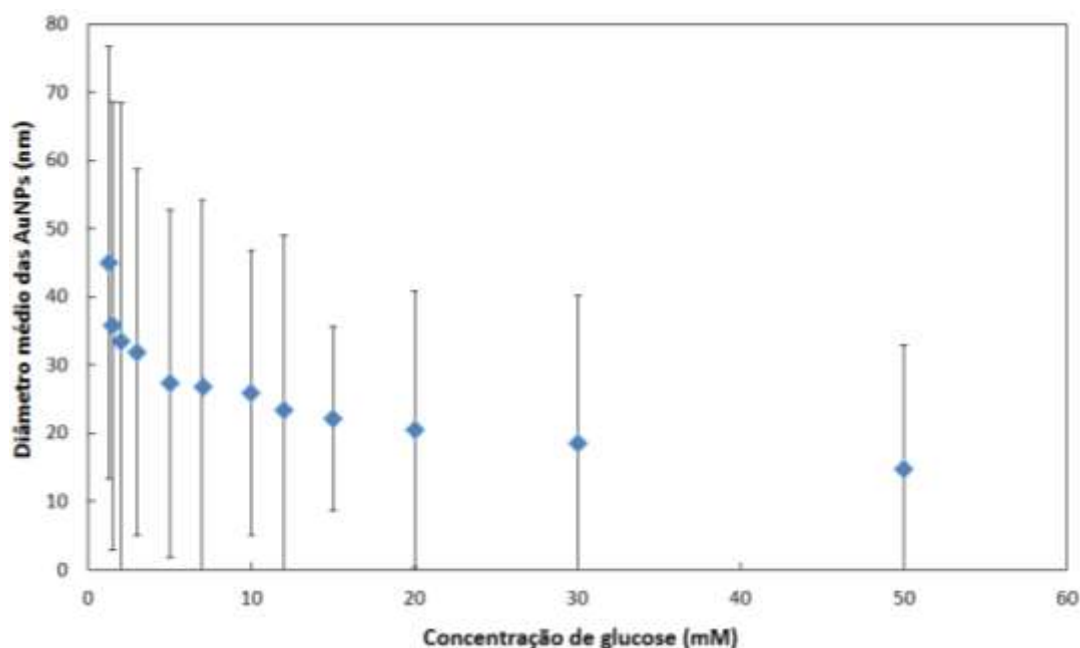
**Figura 5.13:** Espectro EDS da amostra de AuNPs sintetizadas utilizando uma concentração de glucose de 50 mM e identificação dos picos característicos.

### 5.2.2. Dispersão Dinâmica da Luz

A DLS permitiu avaliar de uma forma mais rigorosa o diâmetro das AuNPs produzidas e o modo como este se relaciona com as diferentes concentrações de glucose utilizadas no processo de síntese.

De forma a garantir uma boa interação entre a luz e as amostras a analisar, efetuou-se uma diluição de 1:15 de todas as soluções de AuNPs em água desionizada de modo a induzir uma atenuação da cor, tornando-as mais transparentes. As soluções diluídas foram depois colocadas em pequenas *cuvettes* descartáveis de policarbonato, as quais foram então introduzidas uma a uma no espectrofotómetro para posterior análise das amostras, obtendo-se gráficos com variações de intensidade resultantes da interação da luz com a amostra e da sua consequente dispersão em diferentes direções. Com base nessas variações de intensidade, o *software* utilizado procedeu automaticamente ao cálculo do diâmetro médio das AuNPs em solução, assim como dos respetivos desvios-padrão.

Os resultados obtidos encontram-se apresentados no gráfico da **Figura 5.14** e na **Tabela 0.2** apresentada no **Anexo II**.



**Figura 5.14:** Variação do diâmetro médio das AuNPs em solução, em função da concentração de glucose utilizada no processo de síntese. Um aumento da concentração de glucose está associado a uma diminuição do diâmetro das NPs.

Analisando a referida tabela e o gráfico da **Figura 5.14** é possível concluir que, tal como era expectável, à medida que se aumenta a concentração de glucose utilizada no processo de síntese das AuNPs se verifica uma diminuição do diâmetro médio das AuNPs formadas, o qual varia entre os 14 nm (para uma concentração de 50 mM) e os 45 nm (para uma concentração de 1,25 mM). Os resultados obtidos através da DLS permitem assim confirmar os resultados obtidos através da TEM, verificando-se uma complementaridade de técnicas de caracterização.

Nota ainda para os desvios-padrão calculados, que apresentam valores extremamente elevados. Estes valores podem ser explicados pelo facto da luz interagir com diferentes conjuntos de NPs, alguns deles possivelmente aglomerados, o que resulta numa grande diversidade de tamanhos dessas NPs e no consequente aumento do erro associado às medições efetuadas com recurso à técnica de DLS. Ainda assim, é possível observar a tendência da diminuição do tamanho das NPs com o aumento da concentração de glucose.

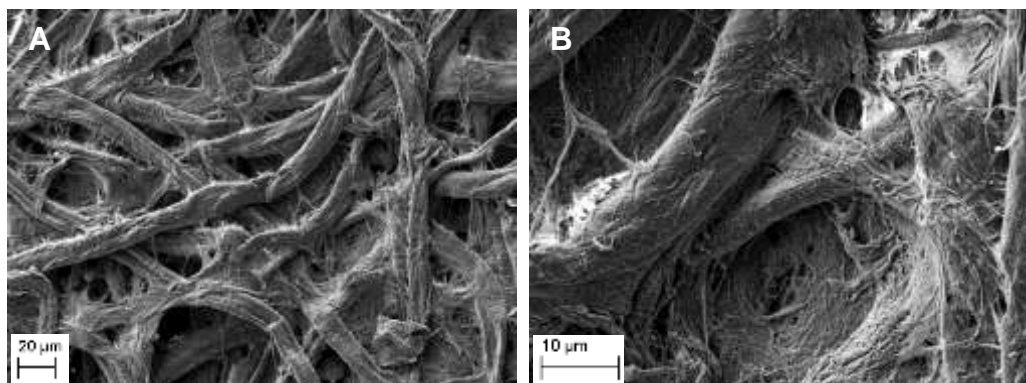
### 5.3. Caracterização de diferentes tipos de substratos de papel

No presente trabalho, foi realizada a caracterização dos diferentes substratos de papel testados e utilizados no desenvolvimento do sensor de papel: papel Whatman nº1, papel de fotocópia e papel mata-borrão. Uma vez que estes papéis são usados como suporte para os ensaios colorimétricos efetuados, é fundamental obter informações acerca das suas propriedades estruturais, morfológicas, químicas e térmicas.

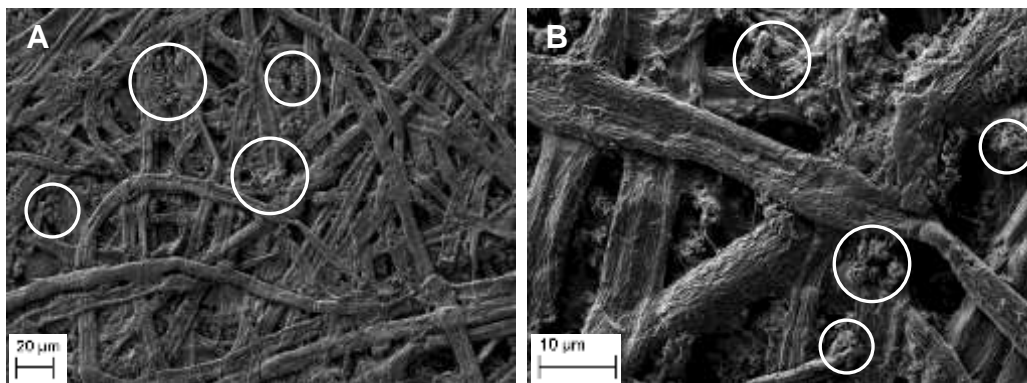
Foram utilizadas as seguintes técnicas de caracterização: Microscopia Eletrónica de Varrimento com Espetroscopia Dispersiva de Raios-X, Difração de Raios-X, Espetroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, Espetroscopia Raman, Termogravimetria, Calorimetria Diferencial de Varrimento e medição do Ângulo de Contacto.

#### 5.3.1. Microscopia Eletrónica de Varrimento

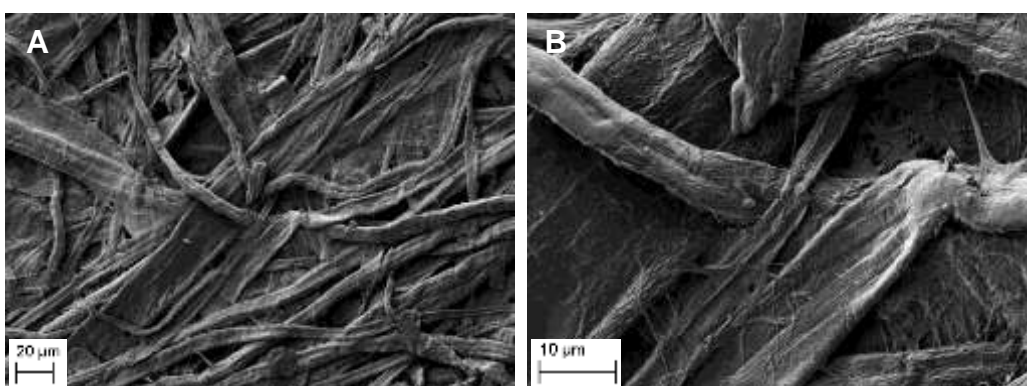
A Microscopia Eletrónica de Varrimento foi utilizada com o objetivo de observar o mais detalhadamente possível a morfologia superficial dos substratos de papel considerados. As imagens de SEM do papel Whatman nº1, do papel de fotocópia e do papel mata-borrão encontram-se apresentadas nas **Figuras 5.15, 5.16 e 5.17**, respetivamente.



**Figura 5.15:** Imagens de SEM do papel Whatman nº1 com uma ampliação de **(A)** 250x e **(B)** 1000x.



**Figura 5.16:** Imagens de SEM do papel de fotocópia com uma ampliação de (A) 250x e (B) 1000x. As circunferências a branco indicam a existência de aglomerados cristalinos nas fibras do papel.



**Figura 5.17:** Imagens de SEM do papel mata-borrão com uma ampliação de (A) 250x e (B) 1000x.

Analisando as imagens de SEM apresentadas, é possível observar que, tal como era expectável, existem diferenças na morfologia dos três substratos de papel. Embora seja visível a rede tridimensional de fibras de celulose que constituem cada um dos papéis, essas fibras apresentam geometrias distintas dependendo do tipo de papel: enquanto as fibras do papel de fotocópia são mais achatadas, as do papel Whatman e do papel mata-borrão possuem uma geometria mais cilíndrica, o que contribui para uma maior espessura desses papéis, sobretudo do papel mata-borrão. Relativamente à disposição das fibras, estas têm uma orientação horizontal resultante das ações mecânicas às quais foram sujeitas durante o processo de fabrico do papel.

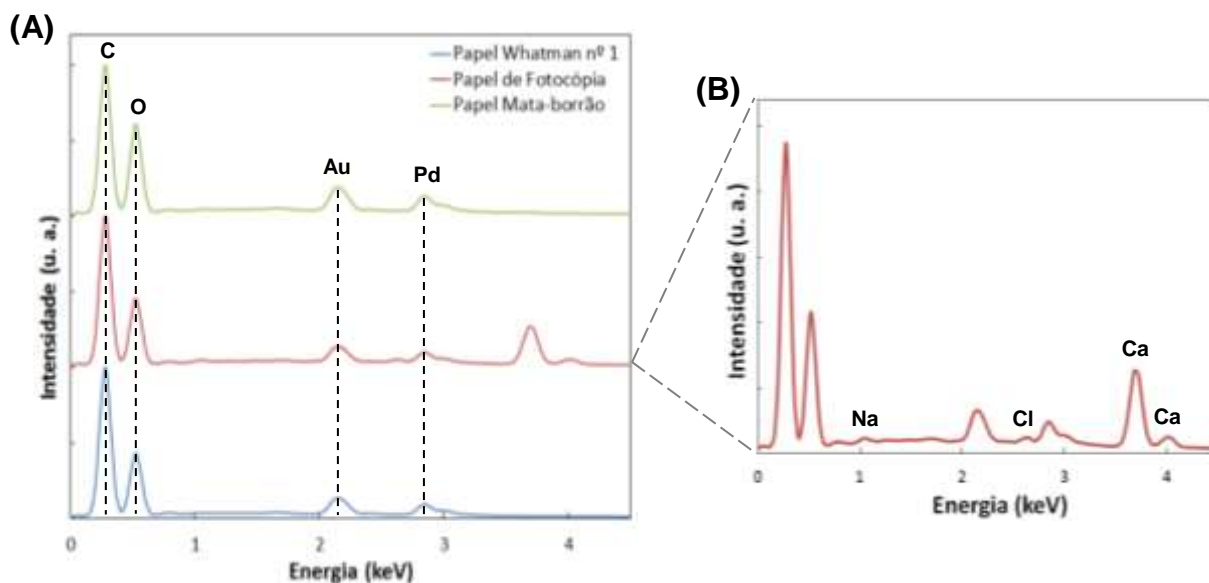
Verifica-se também uma diferença significativa de porosidade entre os papéis: o papel Whatman é o mais poroso, seguido do papel mata-borrão, enquanto o papel de fotocópia é aquele que apresenta uma maior densidade de fibras e consequentemente uma menor porosidade e uma superfície mais uniforme, o que o torna ideal como suporte para a escrita e impressão.

Finalmente é ainda possível observar nas imagens de SEM do papel de fotocópia (Figura 5.16) a presença de aglomerados cristalinos nas superfícies das fibras, que correspondem muito provavelmente ao  $\text{CaCO}_3$  adicionado durante o processo de fabrico deste papel e que é responsável por lhe conferir uma maior opacidade, brilho e brancura<sup>[10, 14]</sup>.

### 5.3.1.1. Espectroscopia Dispersiva de Raios-X

De modo a complementar os resultados obtidos por SEM e a confirmar que os aglomerados cristalinos observados nas imagens do papel de fotocópia são de facto constituídos por  $\text{CaCO}_3$ , foi efetuada uma análise elementar por Espectroscopia Dispersiva de Raios-X, tornando possível a identificação dos elementos químicos presentes nas amostras.

A **Figura 5.18A** apresenta os espectros cumulativos da análise EDS de cada um dos substratos de papel.



**Figura 5.18:** Análise EDS dos substratos de papel utilizados: **(A)** Espectros cumulativos e identificação dos elementos químicos comuns a todos os tipos de papel; **(B)** Ampliação do espectro referente ao papel de fotocópia e identificação dos elementos químicos presentes apenas neste tipo de papel.

Nos espectros EDS relativos ao papel Whatman nº1 e ao papel mata-borrão, é possível observar quatro picos característicos. Os dois picos mais à esquerda no espectro correspondem ao carbono ( $E = 0,28$  keV) e ao oxigénio ( $E = 0,52$  keV), sendo, tal como era expectável, os que possuem maiores intensidades, uma vez que são os elementos que constituem o componente em maior quantidade no papel – a celulose. Já os picos correspondentes às energias  $E = 2,12$  keV e  $E = 2,84$  keV dizem respeito ao ouro e ao paládio, respetivamente, usados como cobertura metálica (*coating*) dos substratos analisados.

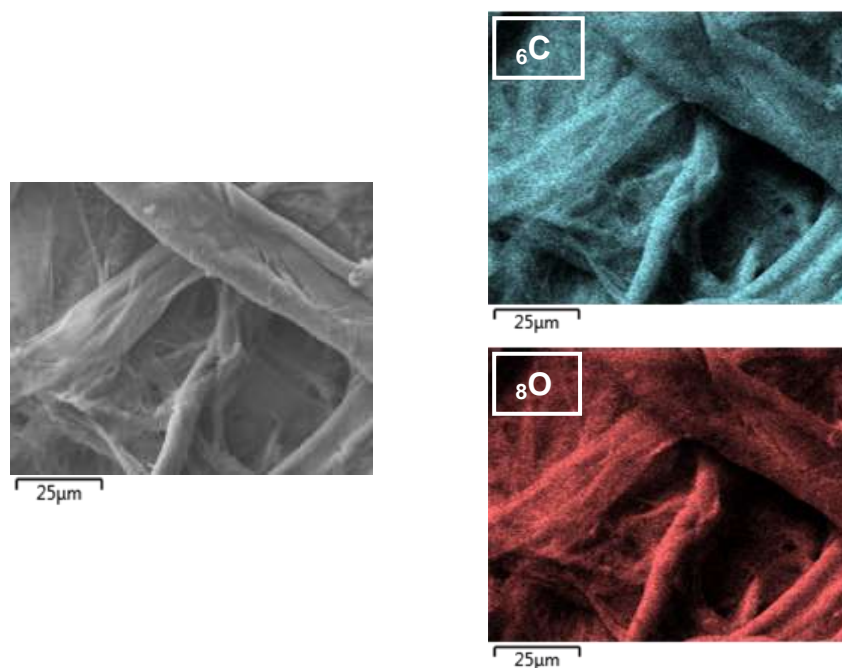
O espectro EDS relativo ao papel de fotocópia (**Figura 5.18B**) apresenta, para além dos picos referidos anteriormente, dois picos característicos do cálcio ( $E = 3,6$  keV e  $E = 4,0$  keV), o que permite confirmar que os aglomerados cristalinos observados nas imagens de SEM correspondem efetivamente ao  $\text{CaCO}_3$ .

No caso do papel de fotocópia, foram ainda detetados outros elementos, embora em quantidades residuais, nomeadamente o sódio ( $E = 1,04$  keV) e o cloro ( $E = 2,6$  keV). De referir ainda que a técnica de EDS não permite detetar hidrogénio, elemento constituinte da celulose, juntamente com o carbono e o oxigénio, razão pela qual não aparece no espectro qualquer pico associado a este elemento.

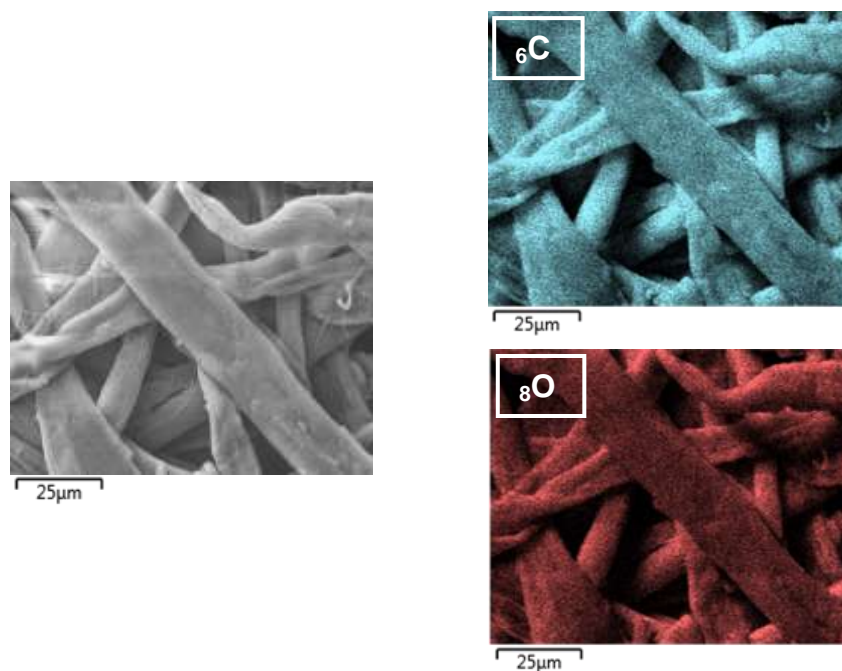


Para além do espectro cumulativo, a análise EDS fornece também um mapa de distribuição dos diferentes elementos presentes na amostra. Os mapas são obtidos através de milhares de varrimentos do feixe de eletrões na área selecionada. Quando os detetores detetam a presença de um determinado elemento, o *software* do equipamento acrescenta um pixel branco na zona correspondente a essa deteção <sup>[14]</sup>.

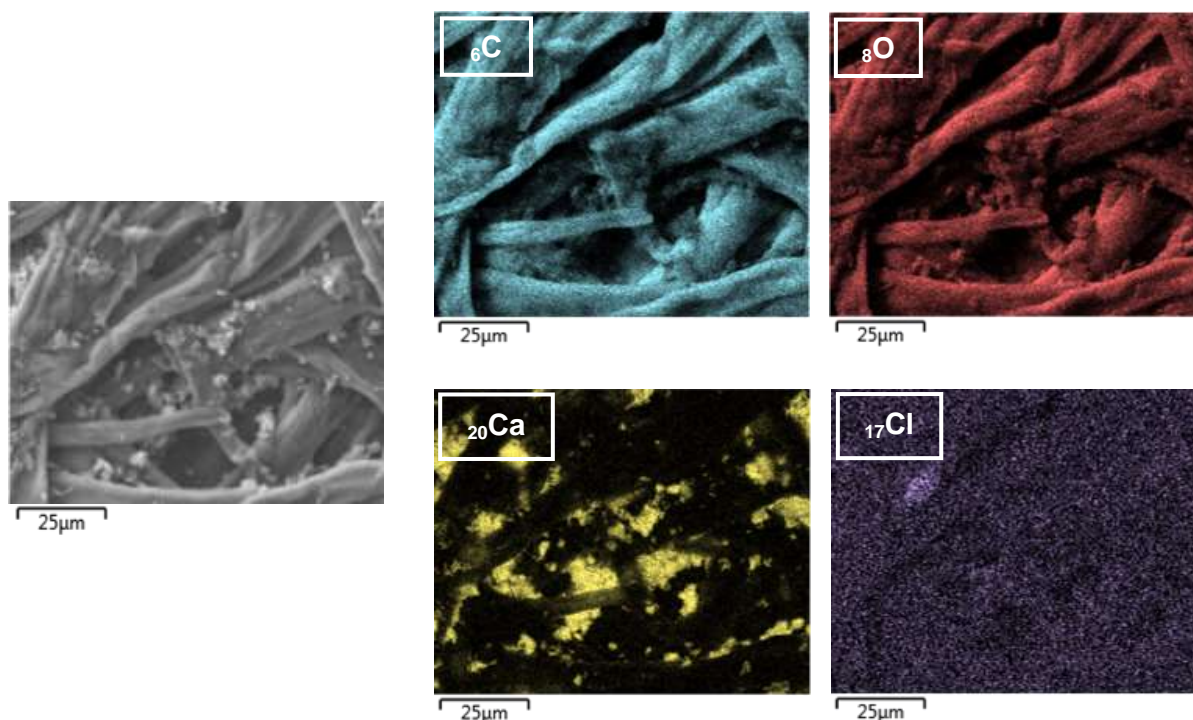
As **Figuras 5.19, 5.20 e 5.21** mostram os mapas de distribuição dos principais constituintes de cada um dos tipos de papel analisados.



**Figura 5.19:** Imagem de SEM e mapas de distribuição dos elementos detetados no papel Whatman nº1. As imagens foram coloridas artificialmente de forma a facilitar a análise das mesmas.



**Figura 5.20:** Imagem de SEM e mapas de distribuição dos elementos detetados no papel mata-borrão. As imagens foram coloridas artificialmente de forma a facilitar a análise das mesmas.



**Figura 5.21:** Imagem de SEM e mapas de distribuição dos elementos detetados no papel de fotocópia. As imagens foram coloridas artificialmente de forma a facilitar a análise das mesmas.

A intensidade de cor nos mapas de distribuição corresponde à deteção de cada elemento na amostra analisada. Assim, analisando os mapas apresentados é possível concluir que o carbono e o oxigénio são de facto os principais constituintes de todos os tipos de papel, sendo inclusive os únicos constituintes do papel Whatman e do papel mata-borrão.

Já o elemento cálcio encontra-se presente em menor quantidade mas ainda assim numa proporção considerável em relação ao carbono e ao oxigénio, estando o seu mapa de distribuição de acordo com a presença dos aglomerados cristalinos entre as fibras de celulose do papel de fotocópia.

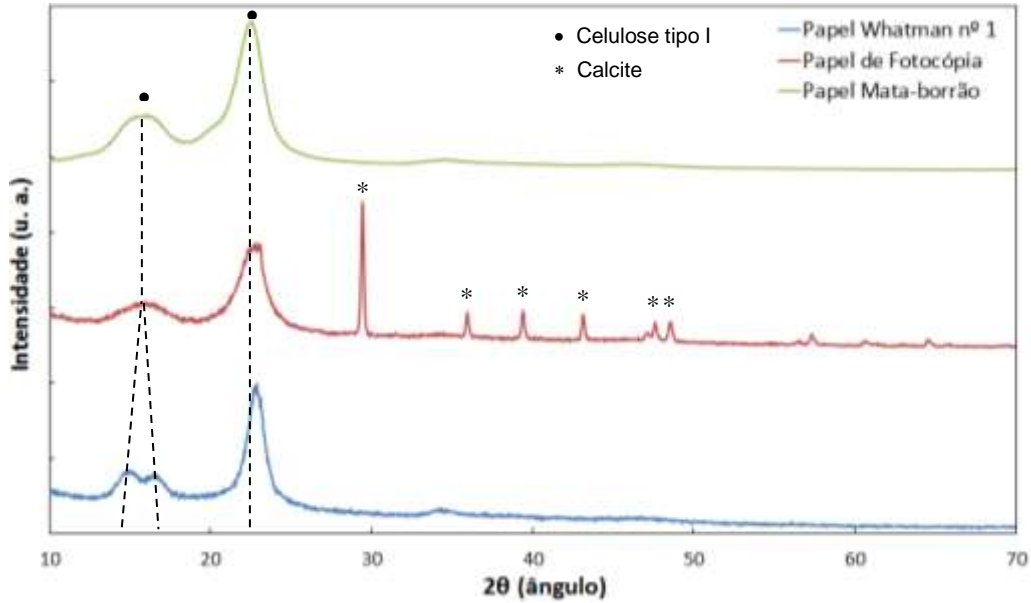
De referir ainda que a análise EDS por si só não é suficiente para fornecer toda a informação necessária à identificação dos constituintes de uma amostra dado que apenas deteta os elementos relativos, no entanto a sua complementaridade com outras técnicas permite proceder a essa identificação de uma forma bastante válida.

### 5.3.2. Difração de Raios-X

A Difração de Raios-X permitiu efetuar uma análise estrutural dos substratos de papel considerados, tornando possível a identificação das estruturas cristalinas neles presentes.

Os difratogramas obtidos, assim como a identificação dos picos característicos encontram-se apresentados na **Figura 5.22**.





**Figura 5.22:** Difratogramas dos substratos de papel analisados e identificação das estruturas cristalinas neles presentes.

A análise dos difratogramas acima permite verificar que todos os substratos de papel apresentam os picos característicos da celulose tipo I, a qual apresenta uma estrutura cristalina (ao contrário da celulose tipo II que é amorfa) que pode ser dividida em dois tipos: celulose  $I_\beta$  (estrutura monoclinica) e celulose  $I_\alpha$  (estrutura triclinica). Estes dois tipos podem coexistir estruturalmente <sup>[109, 110]</sup>. No caso do difratograma do papel Whatman, observa-se a existência de dois picos distintos de difração a 14,92° e 16,60°, enquanto no caso dos difratogramas dos papéis de fotocópia e mata-borrão se observa a fusão desses dois picos em apenas um pico largo a 15,97°. Isto acontece quando os substratos de papel possuem nas suas fibras grandes quantidades de materiais amorfos, como a lenhina e a hemicelulose. Para além deste pico, observa-se ainda em todos os substratos de papel a existência de um outro pico característico da celulose tipo I a 22,80° <sup>[111, 112]</sup>.

O difratograma do papel de fotocópia permite identificar uma outra estrutura cristalina – a calcite (ou carbonato de cálcio) – que não se encontra presente nos restantes papéis analisados, tal como sugerido anteriormente pelos resultados de SEM e EDS.

Para o cálculo do índice de cristalinidade ( $I_c$ ) dos diferentes substratos de papel, foi utilizado o método empírico de Segal *et al.* <sup>[113]</sup>:

$$I_c (\%) = \frac{I_{(002)} - I_{(am)}}{I_{(002)}} \times 100 \quad Eq. 5.1$$

onde  $I_{(002)}$  representa a intensidade máxima do plano (002) da estrutura cristalina da celulose tipo I (pico a 22,80°) e  $I_{(am)}$  representa a intensidade de difração da componente amorfa do material, que corresponde a um ângulo  $2\theta = 18^\circ$ .

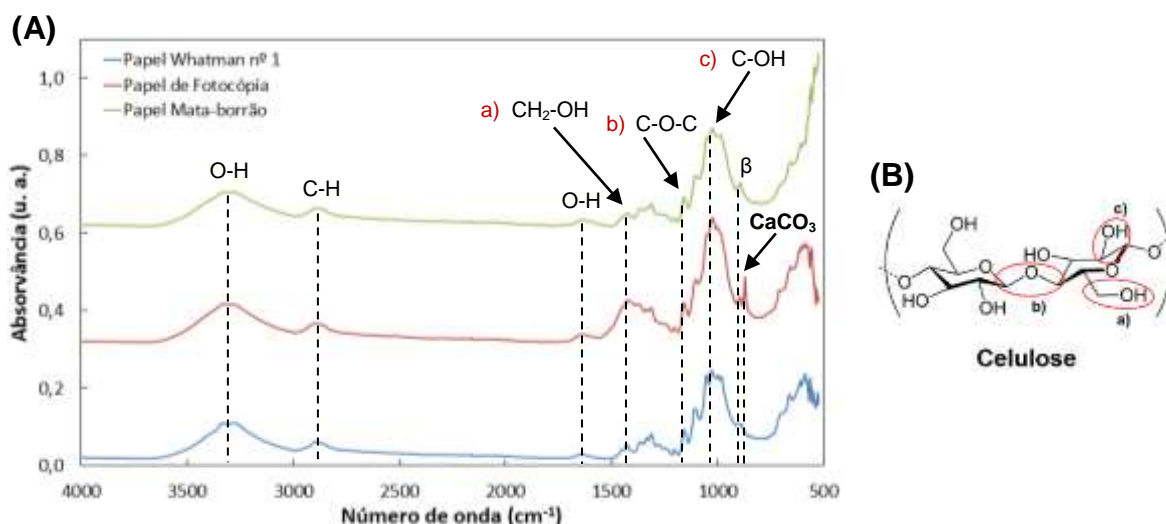
Foram obtidos os seguintes índices de cristalinidade: 78,81% para o papel mata-borrão, 74,37% para o papel Whatman e 69,17% para o papel de fotocópia, reforçando aquilo que foi dito em relação ao conteúdo de celulose de cada um dos substratos.

### 5.3.3. Espetroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

A Espetroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier foi utilizada com o propósito de obter, de uma forma simples e rápida, informação relativa à composição química dos substratos de papel estudados, permitindo identificar as ligações químicas e os grupos funcionais presentes nos mesmos, complementando os resultados obtidos por DRX.

Obtiveram-se espectros de FTIR utilizando o módulo ATR, que foram posteriormente sujeitos a uma correção automática da linha de base e a uma supressão atmosférica também automática de modo a remover as interferências de  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CO}_2$ . O *software* utilizado na obtenção e tratamento dos espectros foi o *OMNIC Suite* da *Thermo Scientific*.

Os espectros correspondentes aos diferentes tipos de papel encontram-se apresentados na **Figura 5.23A**.



**Figura 5.23:** Análise química dos substratos de papel considerados: **(A)** Espectros de FTIR-ATR e identificação das ligações químicas correspondentes aos picos característicos; **(B)** Estrutura química da celulose.

Observando os espectros representados, é visível a semelhança existente entre eles devido aos seus principais constituintes serem os mesmos, neste caso as fibras de celulose. Todos os espectros apresentam bandas e picos nas mesmas posições, pelo que as suas análises foram realizadas de um modo genérico.

A banda por volta dos  $3304\text{ cm}^{-1}$  e o pico a  $1618\text{ cm}^{-1}$  estão associados às vibrações O-H das moléculas de água absorvidas pela estrutura cristalina da celulose, ao passo que o pico a cerca de  $2877\text{ cm}^{-1}$  corresponde às ligações C-H presentes na celulose. Esta predominância de ligações envolvendo o átomo de hidrogénio nesta região do espectro está associada ao peso deste átomo que, sendo de uma ordem de grandeza inferior à dos restantes átomos que compõem uma molécula orgânica, vibra a frequências mais elevadas uma vez que as suas ligações necessitam de mais energia para serem perturbadas. Na região entre  $1500$  e  $900\text{ cm}^{-1}$ , denominada região de impressão digital, é possível identificar diversos picos de absorção: o pico a  $1423\text{ cm}^{-1}$  corresponde à deformação assimétrica das ligações  $\text{CH}_2\text{-OH}$  dos grupos hidroxilo (**Figura 5.23B – a)**), o pico a  $1157\text{ cm}^{-1}$  é devido à deformação assimétrica das

ligações  $\beta$ -glicosídicas C-O-C (**Figura 5.23B – b)**), o pico a  $1026\text{ cm}^{-1}$  resulta da deformação assimétrica das ligações C-OH (**Figura 5.23B – c)**) e o pico a  $895\text{ cm}^{-1}$  é característico das ligações  $\beta$  estabelecidas entre os anéis de glucose <sup>[10, 14, 114, 115]</sup>.

No caso do papel de fotocópia regista-se ainda um outro pico a  $872\text{ cm}^{-1}$  associado ao  $\text{CaCO}_3$ , o que permite mais uma vez comprovar a presença deste composto neste substrato. Para além deste pico, o  $\text{CaCO}_3$  possui ainda um outro a  $1415\text{ cm}^{-1}$ , porém os picos característicos da celulose existentes nessa zona espectral ocultam este pico impedindo a sua identificação <sup>[10, 14]</sup>.

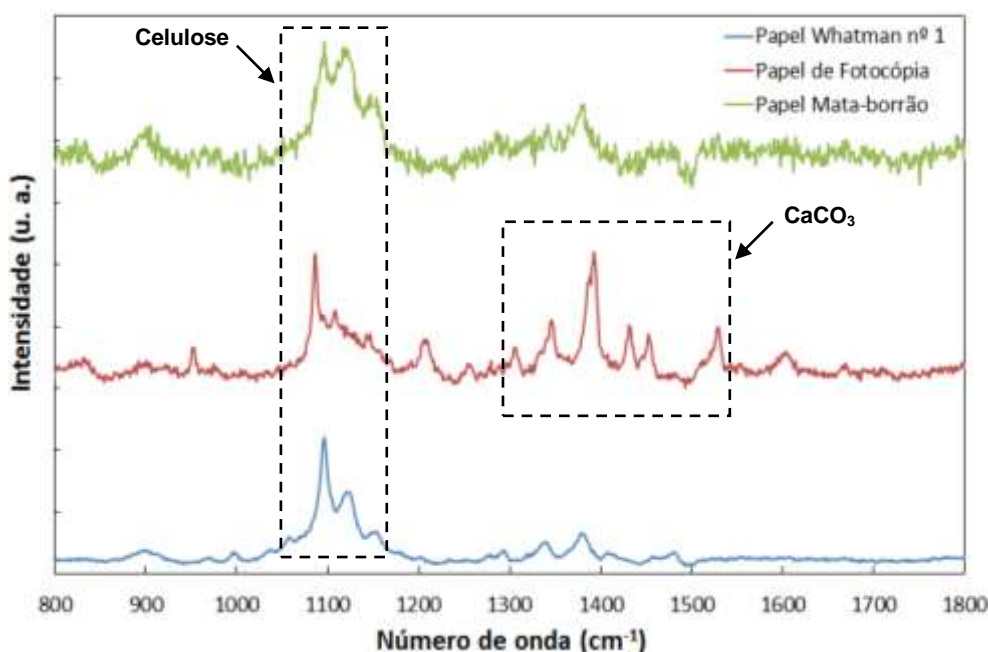
Verifica-se ainda a não existência de picos na região entre  $1750$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$ , característica da hemicelulose e da lenhina, o que sugere que estes componentes não se encontram presentes na constituição de nenhum dos tipos de papel, tendo provavelmente sido removidos durante os seus processos de fabrico.

### 5.3.4. Espetroscopia Raman

A Espetroscopia Raman foi utilizada como técnica complementar da FTIR na análise química dos substratos de papel considerados, permitindo obter informação acerca das ligações químicas presentes nas moléculas que os constituem.

Os espectros Raman obtidos foram posteriormente submetidos a um conjunto de tratamentos específicos, com vista à correção da linha de base e à remoção do ruído bem como de eventuais raios cósmicos presentes no sinal.

Os espectros relativos aos diferentes tipos de papel encontram-se representados na **Figura 5.24**.



**Figura 5.24:** Espectros Raman dos substratos de papel analisados e identificação dos constituintes do papel associados às bandas características.

A análise dos espectros Raman apresentados permite em primeiro lugar verificar a existência de uma região comum a todos os substratos de papel em questão, relativa à presença de celulose, seu principal constituinte. É possível identificar duas bandas características a  $1097$  e  $1118\text{ cm}^{-1}$ , associadas à deformação (simétrica e assimétrica) das ligações  $\beta$ -glicosídicas (C-O-C) entre os monómeros de glucose que formam a celulose <sup>[114, 116]</sup>.

Para além desta região, o espectro correspondente ao papel de fotocópia apresenta ainda um outro conjunto de bandas características entre os  $1300$  e os  $1560\text{ cm}^{-1}$ , que correspondem à presença do  $\text{CaCO}_3$  adicionado durante o processo de fabrico deste papel e cuja presença foi já confirmada por outras técnicas de caracterização.

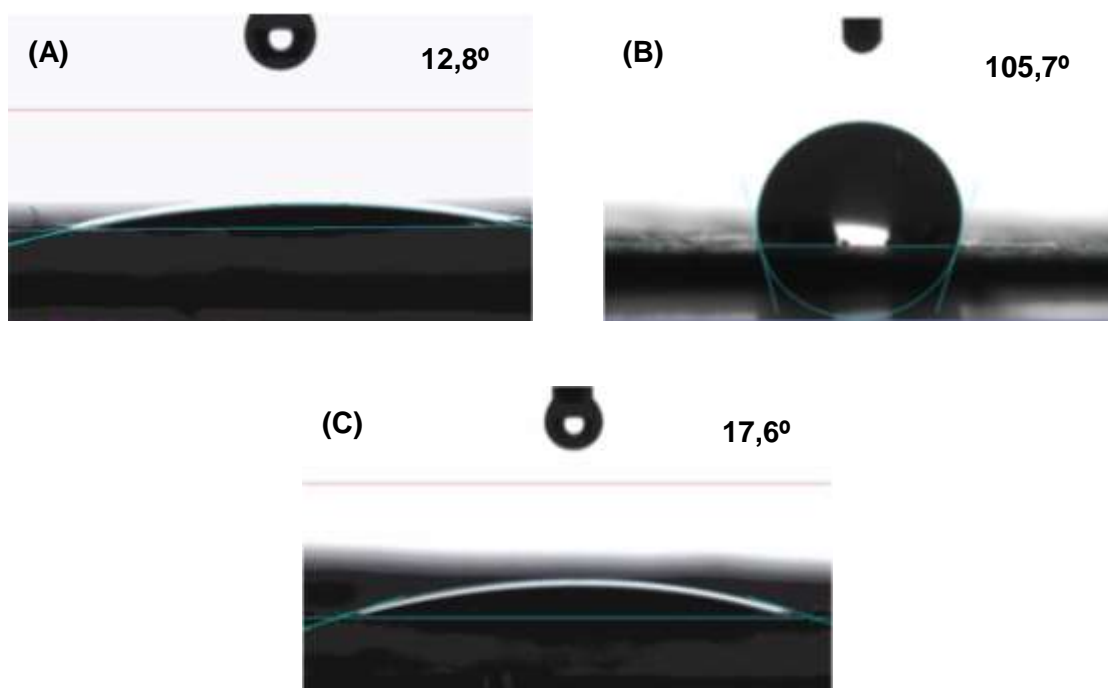
Assim, e embora seja pouco sensível na deteção das ligações que envolvem o átomo de hidrogénio, razão pela qual estas não são observadas nos espectros da **Figura 5.24**, a Espectroscopia Raman permite confirmar os resultados obtidos anteriormente por FTIR.

### 5.3.5. Ângulo de Contacto

A medição do ângulo de contacto dos substratos de papel foi realizada com o objetivo de avaliar a afinidade dos mesmos para materiais líquidos, permitindo caracterizá-los em hidrofílicos ou hidrofóbicos de acordo com a sua maior ou menor capacidade de absorção.

Usando como líquido água desionizada, depositou-se uma gota com  $1\text{ }\mu\text{L}$  de volume sobre a superfície de cada um dos substratos e mediu-se o ângulo de contacto do sistema (papel, água e ar).

Os ângulos de contacto medidos para cada um dos tipos de papel encontram-se na **Figura 5.25**.



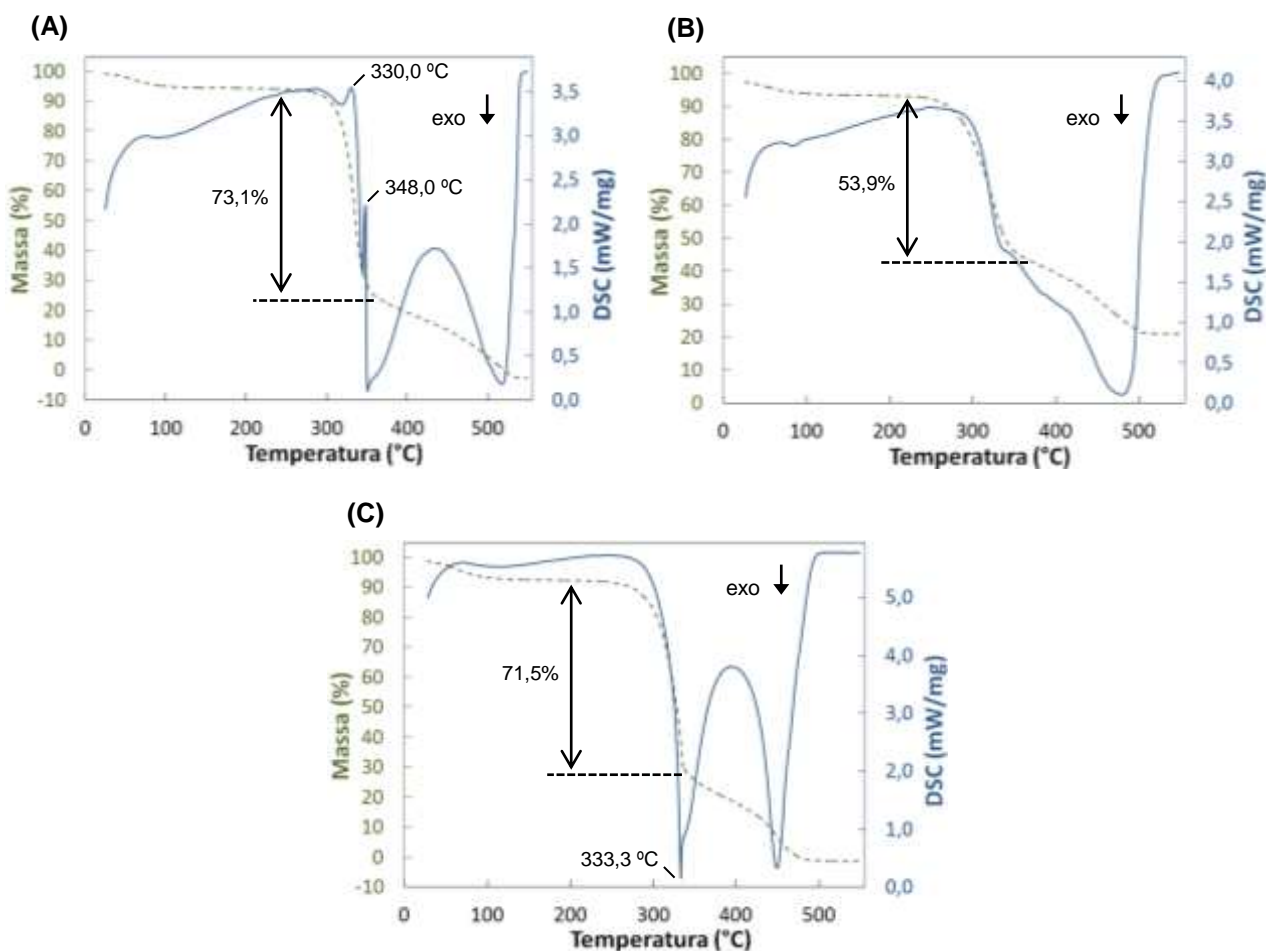
**Figura 5.25:** Ângulos de contacto referentes aos substratos de papel considerados: (A) Papel Whatman nº1, (B) Papel de fotocópia e (C) Papel mata-borrão.

As imagens apresentadas sugerem que, tal como era expectável, tanto o papel Whatman nº1 como o papel mata-borrão são extremamente hidrofílicos, apresentando baixos ângulos de contacto, o que revela uma elevada capacidade de absorção de líquidos. Por outro lado, o papel de fotocópia tem um comportamento bastante mais hidrofóbico, o que se traduz em ângulos de contacto muito maiores e consequentemente numa menor afinidade para os líquidos. A adição de componentes não celulósicos ao papel de fotocópia e o tratamento da sua superfície durante o processo de fabrico estão na origem das diferenças observadas.

### 5.3.6. Análise Térmica

A análise térmica dos substratos de papel considerados foi realizada com o intuito de observar o comportamento destes materiais e as eventuais transformações por eles sofridas quando submetidos a temperaturas elevadas, uma vez que o processo de fabrico dos sensores de papel compreende uma fase de aquecimento a uma temperatura de 120 °C. Por outro lado, a caracterização térmica permite obter informações acerca das condições críticas de operabilidade, transporte e armazenamento dos dispositivos.

As curvas de TG e DSC dos substratos de papel Whatman, papel de fotocópia e papel mata-borrão estão representadas nas **Figuras 5.26A, 5.26B e 5.26C**, respetivamente.



**Figura 5.26:** Análise térmica dos substratos de papel: **(A)** Papel Whatman nº1, **(B)** Papel de fotocópia e **(C)** Papel mata-borrão. As curvas TG encontram-se representadas a tracejado e as curvas DSC a cheio.

A análise dos gráficos apresentados permite verificar a ocorrência de duas perdas de massa no intervalo de temperaturas considerado: a primeira ocorre pouco antes dos 100 °C e corresponde à evaporação da água, resultando numa perda de massa residual (5,3% para o papel Whatman, 4,5% para o papel de fotocópia e 6,8% para o papel mata-borrão). A segunda e mais significativa perda de massa foi registada entre os 300 e os 360 °C e está associada à degradação da celulose, correspondendo a dois picos endotérmicos no gráfico de DSC do papel Whatman (330,0 °C e 348,0 °C) e a um pico exotérmico no gráfico do papel mata-borrão (333,3 °C). Quanto ao gráfico de DSC do papel de fotocópia, não apresenta qualquer pico no intervalo de temperaturas em questão. A perda de massa foi neste caso de 67,8% para o papel Whatman, 49,4% para o papel de fotocópia e 64,7% para o papel mata-borrão. A presença no papel de fotocópia de compostos minerais ( $\text{CaCO}_3$ ), que possuem temperaturas de degradação mais elevadas do que a celulose, pode justificar as diferenças observadas nas curvas de TG e DSC dos substratos analisados.

Conclui-se então que todos os papéis são termicamente estáveis até aos 320 °C, não sofrendo por isso transformações consideráveis quando submetidos a temperaturas inferiores a esta e em particular à temperatura de 120 °C, necessária para a difusão da cera.

A análise das curvas de TG permite ainda concluir acerca da quantidade relativa de celulose e outros constituintes presentes em cada papel analisado, com base nas perdas de massa registadas e considerando que os resíduos resultantes dessas perdas dizem respeito a compostos adicionados às fibras durante o processo de produção do papel. Assim, o papel de fotocópia, com uma percentagem de massa final de 46,1% por volta dos 360 °C, é aquele que apresenta uma maior quantidade de componentes não celulósicos na sua composição. Pelo contrário, o papel Whatman e o papel mata-borrão apresentam percentagens de massa final de 26,9% e 28,5%, respetivamente, o que se reflete numa maior percentagem de celulose presente na sua constituição.

### **5.4. Construção dos sensores de papel para deteção de glucose**

A construção dos sensores de papel para deteção de glucose foi efetuada com base na tecnologia *Lab-on-Paper*, que consiste essencialmente na formação de barreiras de cera hidrofóbicas no papel para delimitar e isolar zonas hidrofílicas onde ocorrem as reações.

Para tal, foi necessário proceder em primeiro lugar à escolha do substrato de papel mais adequado ao tipo de aplicação desenvolvida.

#### **5.4.1. Escolha do substrato**

De modo a seleccionar o substrato mais indicado para o desenvolvimento dos sensores, foram considerados os resultados provenientes da caracterização de cada um deles. Para além disso, foram realizados alguns testes preliminares no que diz respeito à síntese de AuNPs em papel por redução com a glucose utilizando os vários tipos de papel, de forma a averiguar a influência de cada um deles na reação.



No caso do papel mata-borrão, a sua utilização foi descartada devido essencialmente a dois problemas: o primeiro teve a ver com a impossibilidade de difundir a cera impressa na superfície do papel por toda a sua espessura, de modo a formar as barreiras hidrofóbicas e a confinar os líquidos a uma área restrita. De facto, sendo este papel tão espesso a quantidade de cera depositada na sua superfície, bem como a temperatura necessária à difusão da mesma teriam necessariamente que sofrer um aumento. O outro problema prende-se com o aparecimento no papel de uma cor avermelhada aquando da deposição da solução de  $\text{HAuCl}_4$ , ou seja, mesmo antes de ser depositada a solução de glucose, o que impede a sua utilização na aplicação pretendida.

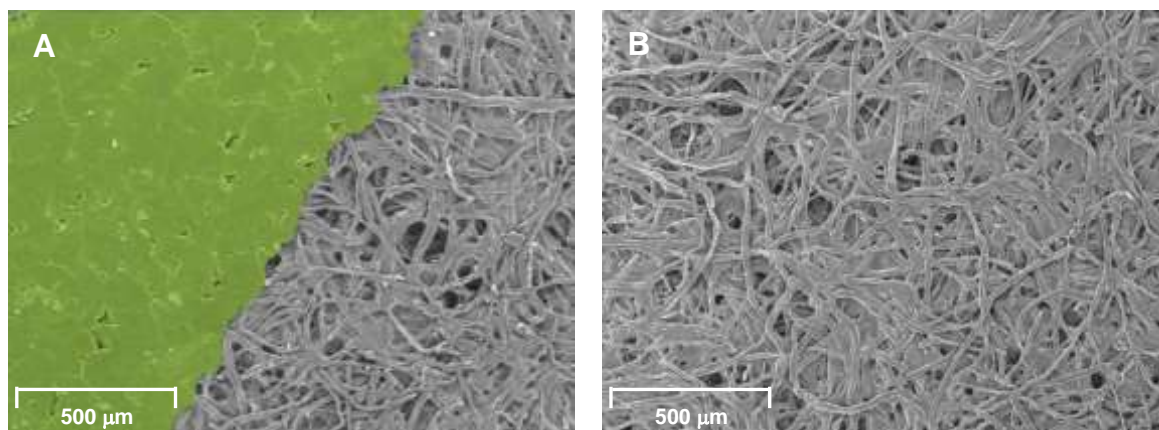
Relativamente ao papel de fotocópia, este tem a desvantagem de ser hidrofóbico, o que faz com que a absorção das soluções demore mais tempo do que seria desejável num teste colorimétrico rápido. Para além disso, a reação entre o  $\text{HAuCl}_4$  e o  $\text{NaOH}$  é suficiente para originar uma mudança de cor do papel, provavelmente devido à presença de aditivos, o que mais uma vez inviabiliza o seu uso no sensor em questão.

Assim sendo, escolheu-se como substrato o papel Whatman nº1, não só devido às suas propriedades (espessura adequada, poroso, hidrofílico e sem componentes adicionais) mas também pelo facto de ser o único no qual se verifica o aparecimento de cor apenas após a deposição de todos os reagentes, podendo como tal ser utilizado no processo de deteção da glucose.

### 5.4.2. Formação das barreiras de cera hidrofóbicas

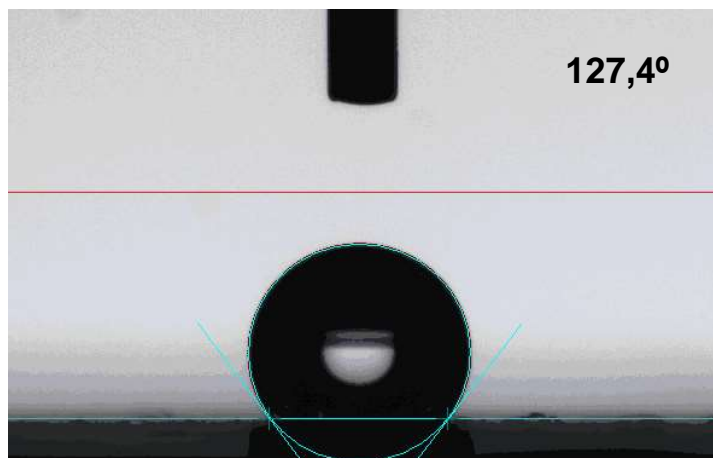
A definição das barreiras hidrofóbicas, formadas pela difusão da cera por toda a espessura do papel, foi necessária para delimitar as regiões hidrofílicas do papel Whatman, criando zonas de teste, sem que ocorra contaminação entre amostras contíguas.

A **Figura 5.27** mostra as imagens de SEM obtidas para cera impressa na superfície do papel e difundida por toda a espessura do mesmo. Observa-se que a cera impressa no papel apresenta uma camada contínua e bastante homogénea (**Figura 5.27A**), e que a sua difusão no papel faz com que ela penetre nas fibras do papel adotando a morfologia das mesmas (**Figura 5.27B**).



**Figura 5.27:** Imagens de SEM de: **(A)** Cera (colorida artificialmente a verde) impressa em papel Whatman; **(B)** Cera difundida em papel Whatman.

A **Figura 5.28** mostra o ângulo de contacto formado entre uma gota de água e o papel Whatman com a cera difundida. O ângulo obtido ( $127,4^\circ$ ) permite assim constatar o caráter hidrofóbico da cera, fundamental no fabrico do sensor de papel.



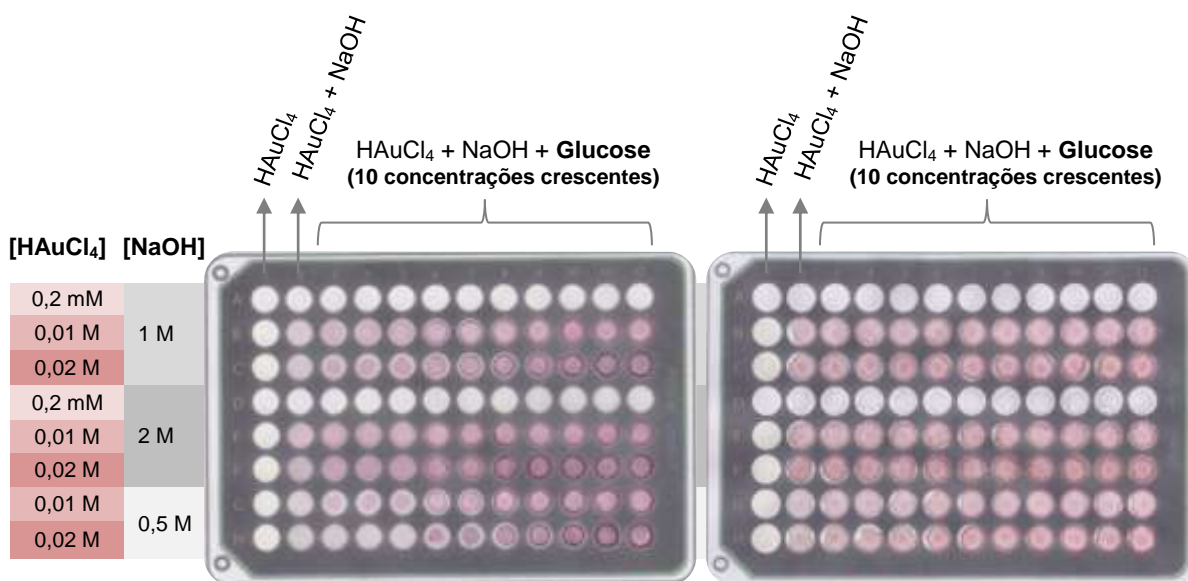
**Figura 5.28:** Ângulo de contacto formado entre uma gota de água e o papel Whatman com a cera difundida.

### 5.5. Síntese de AuNPs em papel por redução com a glucose

De forma a reproduzir em papel a síntese de AuNPs por redução com a glucose, foram inicialmente impressas microplacas de papel de 96 poços em papel Whatman e papel de fotocópia.

Foram testadas diferentes concentrações de  $\text{HAuCl}_4$  e de  $\text{NaOH}$ , combinadas de várias formas de modo a determinar a combinação que garantisse uma reação mais eficaz com a glucose, resultando numa maior amplitude de sinal. Relativamente à glucose, foram utilizadas dez concentrações diferentes (1,25 – 50 mM) de modo a avaliar a sua influência na reação.

Os resultados obtidos encontram-se apresentados na **Figura 5.29**.

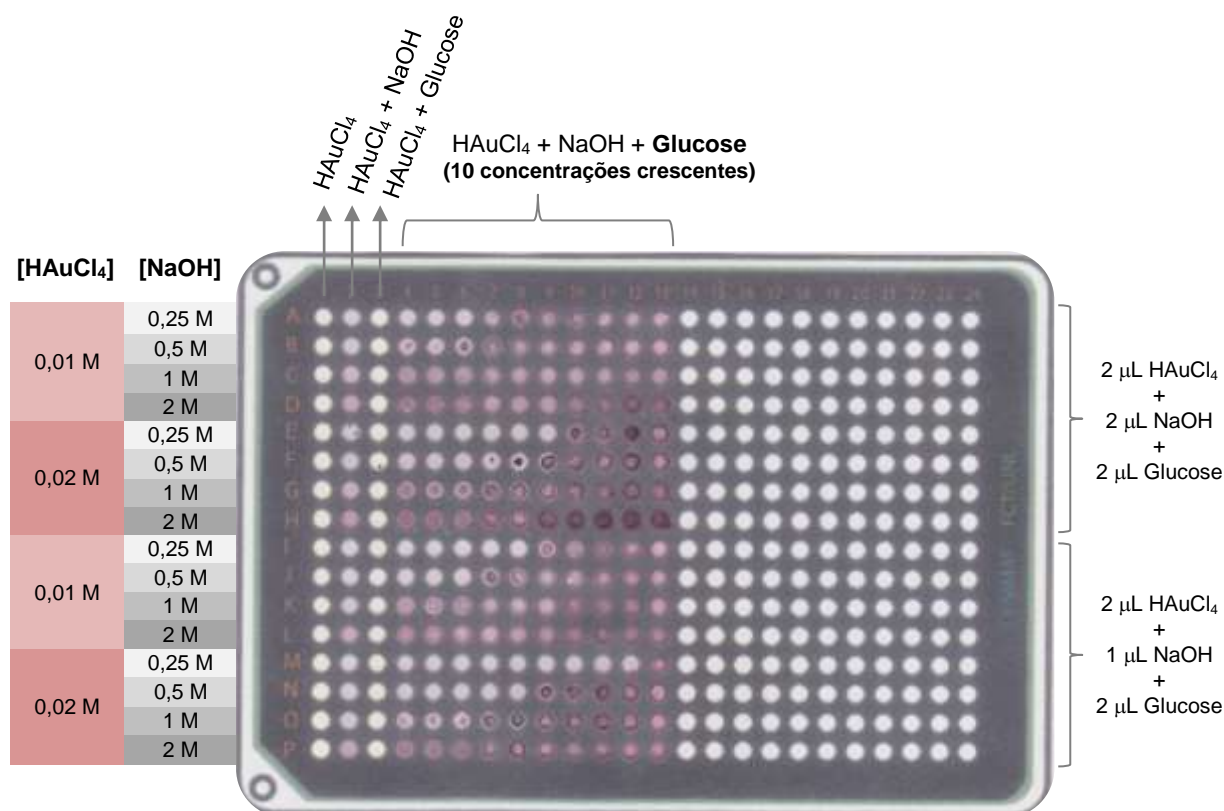


**Figura 5.29:** Síntese de AuNPs em papel por redução com a glucose, efetuada em microplacas de 96 poços, utilizando papel Whatman (à esquerda) e papel de fotocópia (à direita).



Analisando as imagens das microplacas da **Figura 5.29**, é possível observar que a mesma concentração de  $\text{HAuCl}_4$  usada na síntese em solução não foi suficiente para o aparecimento de cor no papel (linhas A e D), pelo que foram testadas mais duas concentrações (50 e 100 vezes maiores) desse reagente (linhas B/E/G e C/F/H, respetivamente). Quanto ao NaOH, o aumento da sua concentração corresponde ao aumento de intensidade da cor dos poços (linhas E e F). É ainda visível que, tal como já foi referido anteriormente, no caso do papel de fotocópia a reação entre o  $\text{HAuCl}_4$  e o NaOH (coluna 2) é suficiente para originar uma mudança de cor do papel, o que inviabiliza a sua utilização no desenvolvimento do sensor.

De modo a estudar a influência do tamanho dos poços nos ensaios colorimétricos realizados, foram utilizadas microplacas de 384 poços em papel Whatman. A concentração e o volume de cada um dos reagentes usados, bem como os resultados colorimétricos obtidos, encontram-se discriminados na **Figura 5.30**.



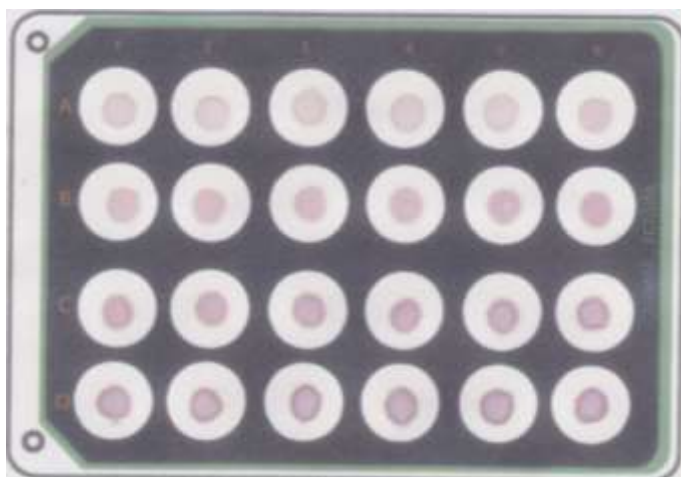
**Figura 5.30:** Síntese de AuNPs em papel por redução com a glucose, efetuada numa microplaca de 384 poços em papel Whatman.

Tal como se pode observar na **Figura 5.30**, as três primeiras colunas da microplaca correspondem aos controlos, pelo que não se verificaram alterações significativas de cor nos respetivos poços, embora nos poços correspondentes à deposição de  $\text{HAuCl}_4$  e NaOH (coluna 2) se consiga observar uma pequena diferença. No entanto, quando se adicionou a glucose aos poços, foi evidente o aparecimento de uma cor vermelha, sendo esta mais intensa à medida que aumenta a concentração de glucose.

Os testes efetuados tanto nas microplacas de 96 poços como nas de 384 poços apresentaram todavia um problema: o efeito de *coffee ring*, que se traduz na formação de um anel com uma coloração mais intensa junto às barreiras de cera que delimitam os poços das microplacas, o que se reflete numa perda de sinal, influenciando a análise RGB. O efeito de *coffee ring* é tão mais visível quanto menores são as dimensões dos poços.

Assim, de modo a ser possível medir corretamente a intensidade dos canais RGB para cada concentração de glucose foram utilizadas microplacas de papel de 24 poços, pois como neste caso o volume dos reagentes não preenche toda a área do poço, não se verifica formação de *coffee ring*. Para além disso, aumentou-se o número de concentrações de glucose testadas de modo a obter mais pontos para uma calibração mais rigorosa do sensor e também com o objetivo de compreender melhor o processo de formação das AuNPs.

A **Figura 5.31** representa um exemplo de uma microplaca de papel de 24 poços utilizada na síntese de AuNPs com 23 concentrações diferentes de glucose (0 – 50 mM), sendo mais uma vez evidente o aumento de intensidade da cor vermelha, associada à formação das AuNPs, com o aumento da concentração de glucose.

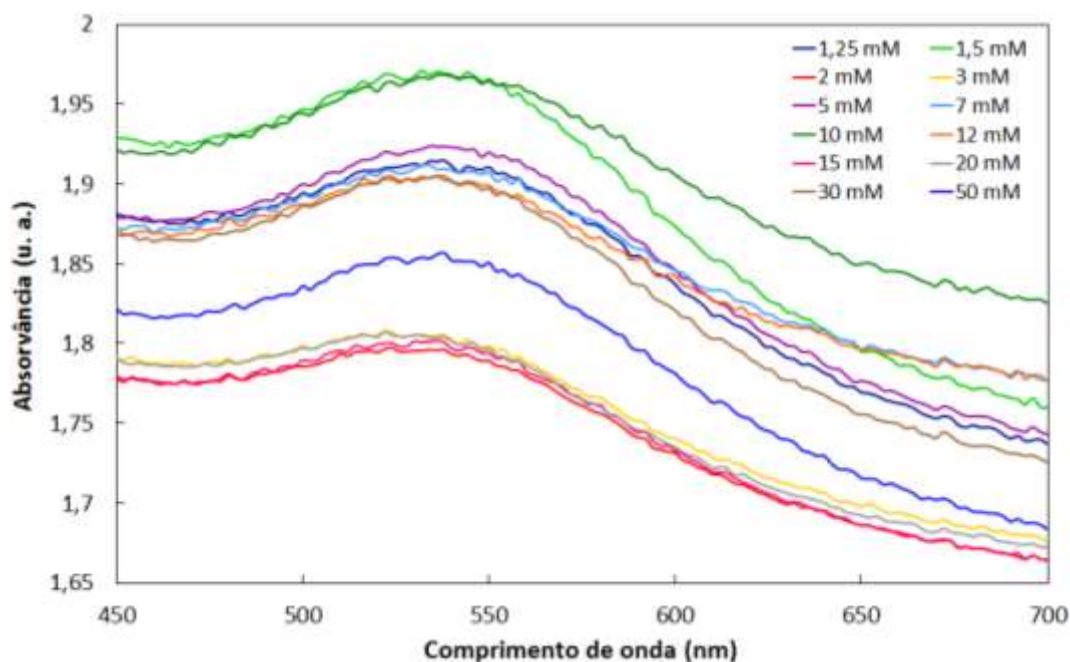


**Figura 5.31:** Síntese de AuNPs em papel por redução com a glucose, efetuada numa microplaca de 24 poços em papel Whatman. O poço A1 corresponde ao controlo com  $\text{HAuCl}_4$  e  $\text{NaOH}$  (sem glucose) e os restantes 23 poços correspondem à reação com concentrações crescentes de glucose do poço A2 para o D6.

### 5.5.1. Espectrofotometria de UV-Vis

Analogamente ao que foi feito para o caso da síntese de AuNPs em solução, os resultados colorimétricos relativos à síntese em papel foram também analisados por espectrofotometria de UV-Vis, de modo a comparar os espectros de absorvância dos diferentes poços da microplaca de papel, associados a diferentes concentrações de glucose.

As medições foram efetuadas utilizando uma microplaca de 96 poços, na gama de comprimentos de onda entre 450 e 700 nm, correspondente à região visível do espectro eletromagnético, tendo sido testadas as mesmas concentrações de glucose que no estudo em solução. Os espectros de absorvância obtidos para cada um dos poços da microplaca de papel encontram-se apresentados no gráfico da **Figura 5.32**.



**Figura 5.32:** Espectros de absorvância correspondentes aos diferentes poços da microplaca de papel Whatman de 96 poços. Embora não se observe nenhum deslocamento da banda SPR, os picos de absorvância apresentados sugerem a existência de AuNPs no papel.

Os espectros de absorvância representados no gráfico da **Figura 5.32**, cujos picos correspondem à detecção de uma cor avermelhada, permitem comprovar a existência de AuNPs no papel, uma vez que também estas estão associadas à presença dessa mesma cor.

No entanto, e contrariamente ao verificado em solução, neste caso não foram observadas alterações consideráveis na posição da banda SPR, encontrando-se os picos das curvas situados num curto intervalo de comprimentos de onda (530 – 540 nm), o que permite concluir que as variações de cor entre os poços da microplaca foram pouco significativas.

### 5.5.2. Análise Digital

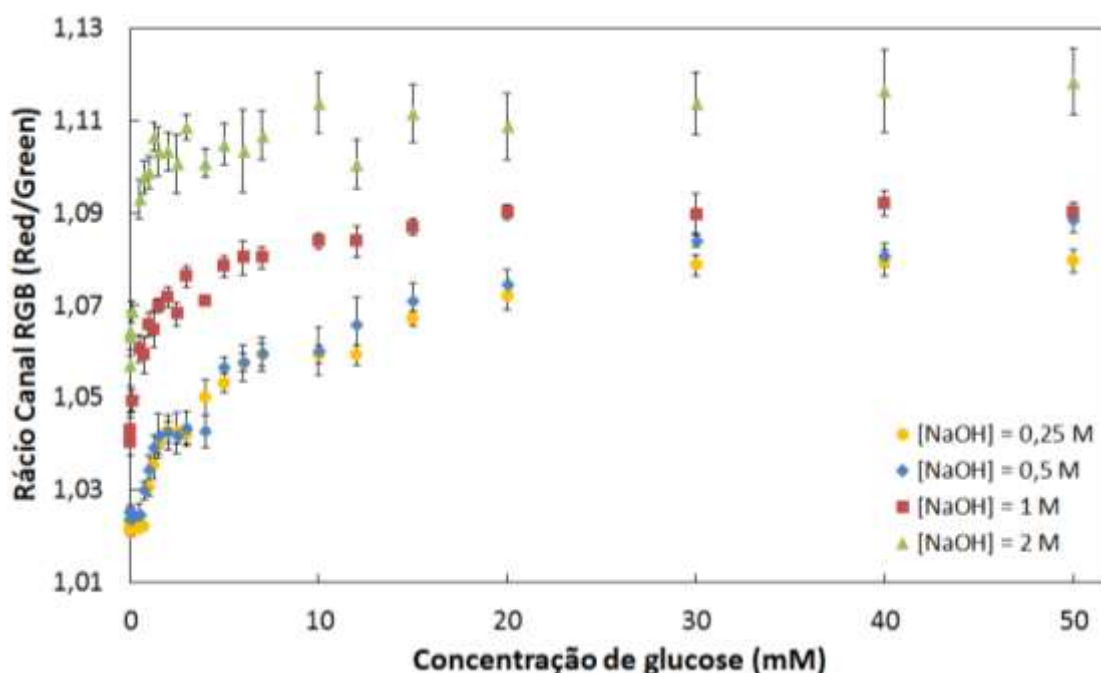
Embora visualmente seja difícil observar alterações colorimétricas significativas ao longo dos poços da microplaca de papel, foi efetuada uma análise digital dos resultados colorimétricos obtidos recorrendo ao *software* de análise de imagem *ImageJ*, de modo a identificar com maior precisão as diferenças de cor ocorridas em função da concentração de glucose utilizada na reação.

Inicialmente foram medidas as intensidades dos canais RGB (*Red Green Blue*) para cada zona de teste da microplaca de 24 poços. Posteriormente, e uma vez que na análise dos ensaios colorimétricos em questão o importante é avaliar a intensidade da cor vermelha, foi calculado o rácio entre a média aritmética das intensidades do canal *Red* e do canal *Green* obtidos para cada uma das referidas zonas de teste.

Foram utilizadas duas concentrações de  $\text{HAuCl}_4$  e quatro de  $\text{NaOH}$ , combinadas de oito formas diferentes, tendo sido efetuadas nove repetições dos testes colorimétricos relativos a cada combinação, de modo a avaliar a reprodutibilidade do teste. Os *outliers* (valores que

apresentam um afastamento significativo em relação aos restantes da série à qual pertencem) foram posteriormente identificados e eliminados, de forma a reduzir o erro associado às medições. Para tal foi utilizado um método baseado na distribuição normal, segundo o qual são considerados *outliers* todos os valores que se encontrem a uma distância da média superior a um determinado número de desvios-padrão <sup>[117]</sup>. Neste caso considerou-se apenas um desvio-padrão, de modo a tentar obter um conjunto de valores o mais homogêneo possível.

Na **Figura 5.33** estão representados os gráficos referentes à análise RGB dos resultados colorimétricos obtidos para uma concentração de  $\text{HAuCl}_4$  de 0,01 M com as diferentes concentrações de NaOH testadas. Já os resultados correspondentes à análise RGB efetuada para cada uma das combinações testadas encontram-se apresentados no **Anexo III**.

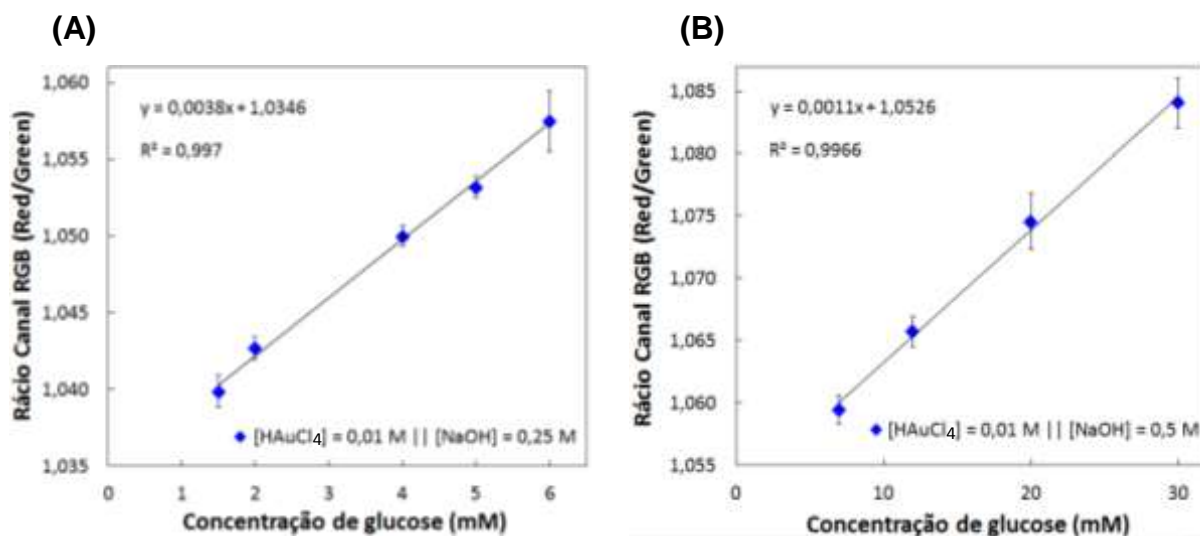


**Figura 5.33:** Análise RGB dos resultados colorimétricos obtidos nas zonas de teste da microplaca de papel. Os resultados apresentados correspondem a uma concentração de  $\text{HAuCl}_4$  de 0,01 M com quatro concentrações diferentes de NaOH.

Observando os gráficos da **Figura 5.33**, é possível verificar um aumento do rácio *Red/Green*, sendo esse aumento mais acentuado ao longo das concentrações mais baixas de glucose e mais suave nas concentrações mais elevadas. Além disso, para concentrações mais elevadas de NaOH os rácios calculados apresentam um comportamento algo aleatório e um intervalo de variação mais pequeno, o que se traduz numa gama de sensibilidade demasiado baixa do sensor em questão para a aplicação pretendida.

Assim, com base nos resultados obtidos para as diferentes combinações efetuadas (**Anexo III**), e dado que nenhuma delas consegue garantir de forma independente uma linearidade ao longo de todo o intervalo de concentrações de glucose analisado, procurou estabelecer-se uma relação de complementaridade entre duas das combinações testadas, de modo a obter uma linearidade na maior gama possível de concentrações. Utilizou-se a mesma concentração de  $\text{HAuCl}_4$  (0,01 M), variando-se a concentração de NaOH (0,25 M e 0,5 M).

As retas obtidas para a calibração do sensor considerado encontram-se apresentadas na **Figura 5.34**.



**Figura 5.34:** Retas de calibração do sensor de papel considerado: **(A)** reta sensível às baixas concentrações de glucose e **(B)** reta sensível às concentrações hiperglicémicas.

Analisando os gráficos acima, é evidente a complementaridade entre as duas retas de calibração apresentadas: enquanto a reta da esquerda (**Figura 5.34A**) revela uma sensibilidade às baixas concentrações de glucose (1,5 – 6 mM), a reta mais à direita (**Figura 5.34B**) mostra-se sensível às concentrações mais elevadas (7 – 30 mM).

A agregação das retas representadas permite assim obter uma relação de linearidade entre a concentração de glucose e o rácio RGB considerado ao longo de uma gama de concentrações bastante alargada, a qual compreende inclusivamente o intervalo de concentrações fisiológicas de glucose tanto em indivíduos normais como em diabéticos.

## 5.6. Caracterização das AuNPs sintetizadas em papel

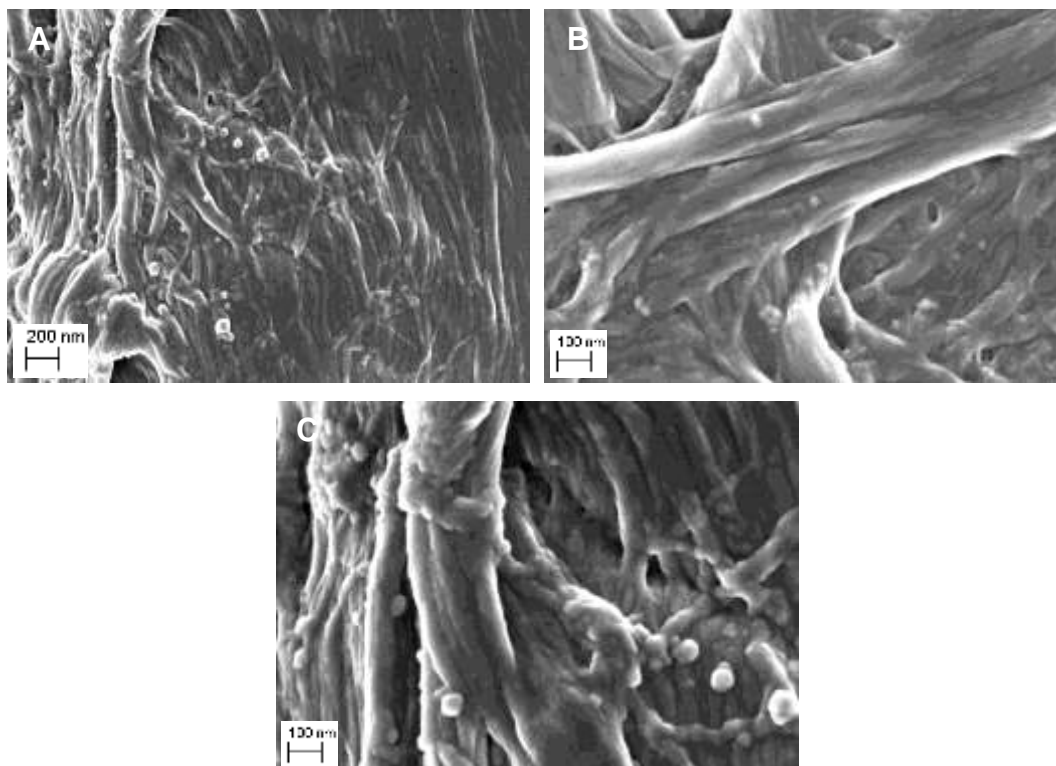
As AuNPs formadas no papel por redução do ácido tetracloreáurico com a glucose foram observadas e caracterizadas com recurso a diferentes técnicas de caracterização, com o propósito de obter informação morfológica, química e estrutural acerca das mesmas.

Foram utilizadas as seguintes técnicas de caracterização: Microscopia Eletrónica de Varrimento, Espectroscopia Dispersiva de Raios-X, Difração de Raios-X e Espectroscopia Raman.

Os resultados relativos a cada uma destas técnicas são apresentados de seguida.

### 5.6.1. Microscopia Eletrónica de Varrimento

De forma a comprovar a presença das referidas AuNPs na superfície do papel Whatman e a observar a morfologia das mesmas, foi utilizada a Microscopia Eletrónica de Varrimento, encontrando-se as imagens obtidas apresentadas na **Figura 5.35**.



**Figura 5.35:** Imagens de SEM das AuNPs sintetizadas em papel Whatman por redução com a glucose: **(A)** ampliação de 20 000x; **(B)** e **(C)** ampliação de 50 000x.

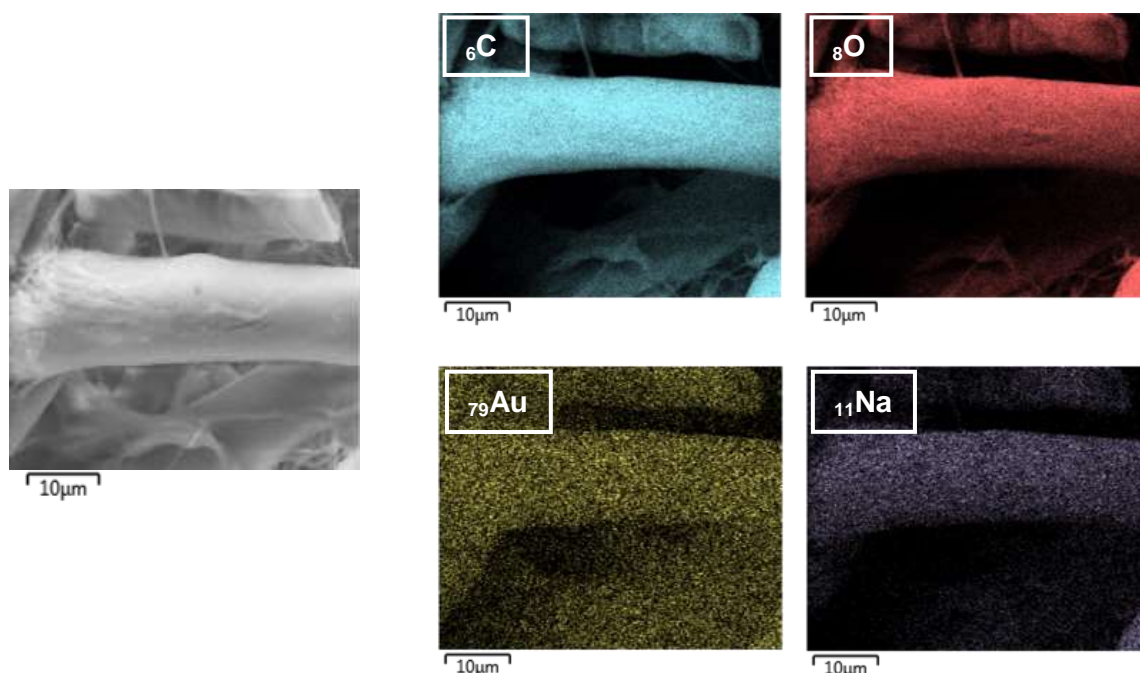
Observando as imagens anteriores é possível verificar que as fibras de celulose que constituem a rede fibrosa do papel se encontram cobertas por vários pontos brancos e brilhantes, os quais correspondem efetivamente às AuNPs. Uma maior ampliação da zona considerada (**Figura 5.35C**) permite observar melhor a sua forma aproximadamente esférica. Relativamente ao diâmetro das AuNPs representadas, o mesmo parece variar, tal como esperado, na ordem das dezenas de nanómetros, embora não seja possível obter essa informação com grande rigor.

### 5.6.2. Espectroscopia Dispersiva de Raios-X

Foi também utilizada a Espectroscopia Dispersiva de Raios-X com o objetivo de confirmar a presença de ouro na superfície do papel. Assim, de forma a tornar possível a deteção deste elemento químico nas amostras, o *coating* efetuado foi neste caso de carbono, ao contrário do de ouro e paládio efetuado anteriormente aquando da caracterização dos diferentes substratos de papel. Os mapas de distribuição dos principais elementos químicos presentes na amostra analisada encontram-se indicados na **Figura 5.36**, tendo os mesmos sido coloridos artificialmente, à semelhança do que foi feito na caracterização dos substratos de papel, de modo a tornar a sua interpretação mais intuitiva.

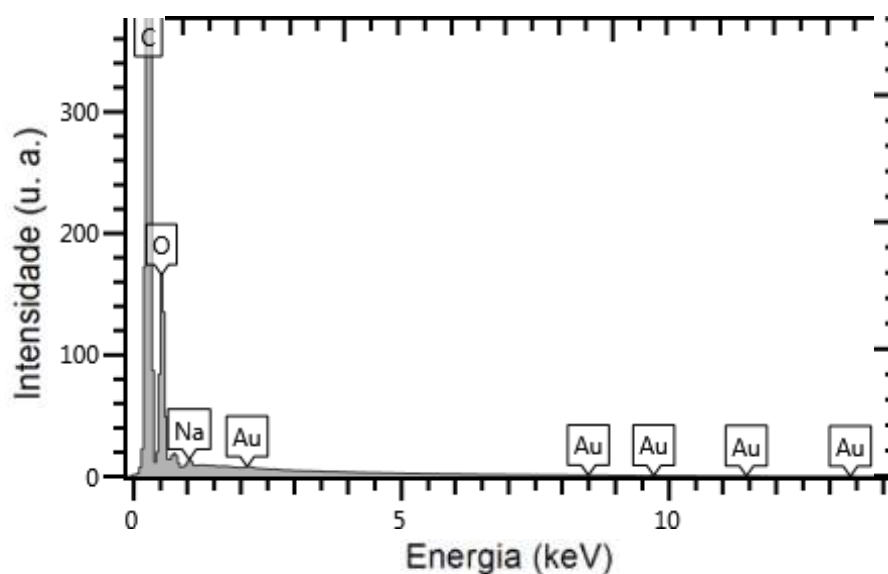
Assim, de acordo com os mapas apresentados foi possível detetar – para além do carbono e do oxigénio, principais constituintes das fibras do papel – a presença de ouro na amostra, resultante da reação entre o  $\text{HAuCl}_4$  e a glucose para a formação das AuNPs. Foi também detetado sódio, cuja presença é justificada pela adição de NaOH ao papel.





**Figura 5.36:** Imagem de SEM e mapas de distribuição dos elementos detetados no papel Whatman com as AuNPs formadas. As imagens foram coloridas artificialmente de forma a facilitar a análise das mesmas.

Para além dos mapas de distribuição, obteve-se também o espectro cumulativo da análise EDS do papel Whatman contendo AuNPs (**Figura 5.37**), através do qual é possível identificar os picos característicos dos elementos químicos mapeados: carbono ( $E = 0,28$  keV), oxigénio ( $E = 0,52$  keV), sódio ( $E = 1,04$  keV) e ouro ( $E = 2,12$  keV). Foram ainda detetados mais quatro picos referentes ao ouro numa zona do espectro de maior energia, no entanto estes podem ser desprezados devido ao facto de apresentarem baixas intensidades relativas.

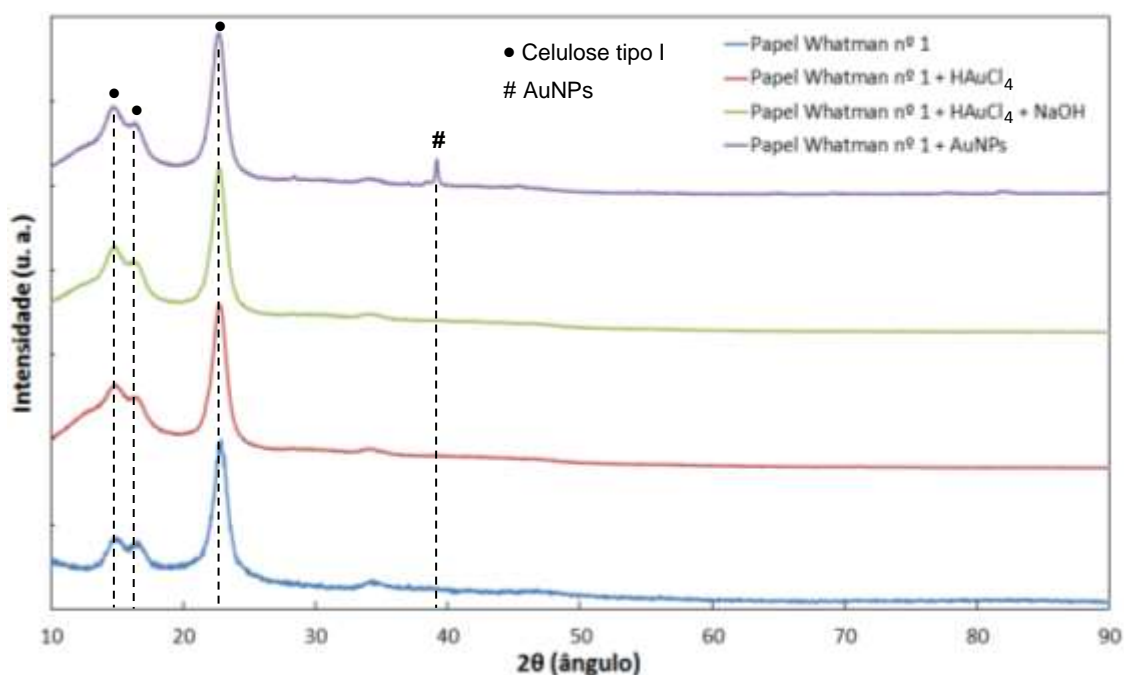


**Figura 5.37:** Espectro cumulativo referente à análise EDS do papel Whatman contendo as AuNPs sintetizadas. Os elementos químicos presentes na amostra encontram-se identificados no espectro.

### 5.6.3. Difração de Raios-X

De modo a complementar os resultados obtidos por SEM e EDS, foi também utilizada a Difração de Raios-X com o intuito de detetar eventuais estruturas cristalinas na superfície do papel, associadas à presença das AuNPs sintetizadas.

Foram efetuadas análises de DRX do papel Whatman sem qualquer reagente depositado e após a deposição de cada um dos reagentes envolvidos na síntese das AuNPs. Os difratogramas obtidos, assim como a identificação dos picos característicos encontram-se apresentados na **Figura 5.38**.



**Figura 5.38:** Comparação entre os difratogramas do papel Whatman com e sem as AuNPs formadas. Os picos característicos das estruturas cristalinas detetadas encontram-se identificados no gráfico.

Analisando os difratogramas representados a azul, vermelho e verde é possível constatar que a adição de  $\text{HAuCl}_4$  e de  $\text{NaOH}$  ao papel Whatman não corresponde à formação de qualquer estrutura cristalina, uma vez que todos os picos detetados são característicos da estrutura cristalina da celulose tipo I que constitui as fibras do próprio papel, tendo os mesmos sido identificados anteriormente aquando da caracterização dos diferentes substratos de papel.

No entanto, o difratograma representado a roxo, que diz respeito à adição de glucose (agente redutor das AuNPs) ao papel com  $\text{HAuCl}_4$  e  $\text{NaOH}$ , apresenta um outro pico por volta dos  $38,5^\circ$ , característico da estrutura cristalina do ouro e correspondente ao plano cristalino com o índice de Miller (111). Para além deste pico, a estrutura cristalina do ouro possui ainda mais três picos característicos ( $44^\circ$ ,  $64^\circ$  e  $77,5^\circ$ ), embora neste caso não tenha sido possível a sua visualização<sup>[118, 119]</sup>. Ainda assim, os resultados obtidos permitiram comprovar a presença de AuNPs no papel Whatman, formadas por redução com a glucose.



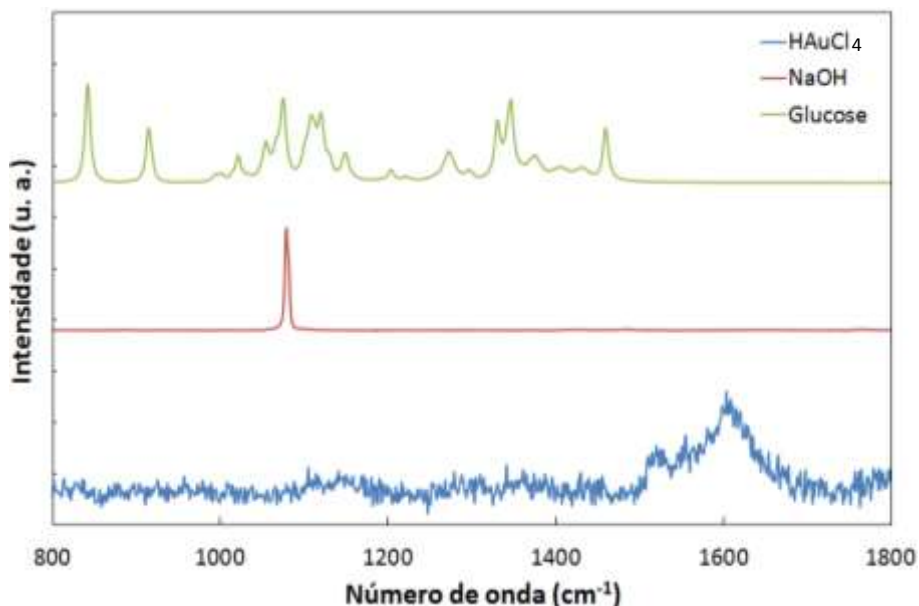
#### 5.6.4. Espetroscopia Raman

A Espetroscopia Raman Amplificada por Superfície (SERS – *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*) é uma técnica de espectroscopia vibracional não destrutiva que se baseia na amplificação dos sinais de Raman de moléculas adsorvidas sobre superfícies metálicas rugosas ou coloidais nanoestruturadas (normalmente ouro, prata ou cobre), proporcionada pela excitação de ressonâncias plasmónicas de superfície. Esta técnica revela uma grande sensibilidade na deteção e caracterização estrutural de moléculas e analitos de baixa concentração <sup>[120, 121]</sup>.

Neste caso, a técnica de SERS foi aplicada na deteção das AuNPs sintetizadas em papel por redução com a glucose. No entanto, antes disso foi necessário proceder à realização de vários testes de controlo, de modo a conhecer a origem de eventuais interferências presentes no sinal de SERS posteriormente adquirido.

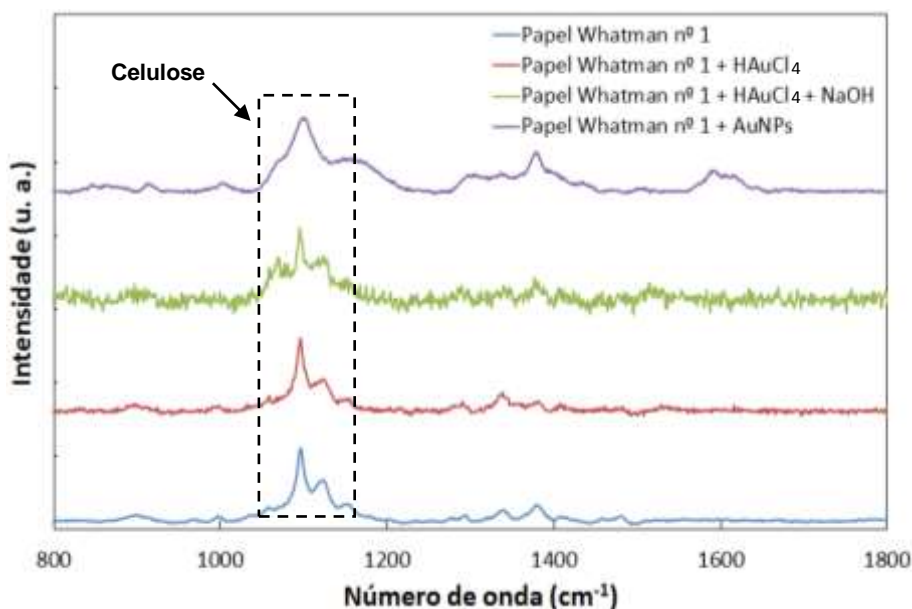
Assim, em primeiro lugar foi realizada Espetroscopia Raman a cada um dos reagentes utilizados no processo de síntese das AuNPs. Os reagentes foram depositados em substrato de vidro e, à semelhança do que foi feito anteriormente aquando da caracterização dos substratos de papel analisados, os espectros Raman obtidos foram sujeitos a uma série de tratamentos com vista à correção da linha de base e à remoção do ruído e de eventuais raios cósmicos provenientes da dispersão de Rayleigh presentes no sinal.

Os espectros relativos aos diferentes reagentes usados encontram-se representados na **Figura 5.39**, sendo possível observar as bandas características de cada um deles, embora a sua identificação não seja relevante para a análise efetuada.



**Figura 5.39:** Espectros Raman dos diferentes reagentes utilizados no processo de síntese das AuNPs.

Foi também realizada Espetroscopia Raman do papel Whatman sem qualquer reagente depositado e após a deposição de cada um dos reagentes envolvidos na síntese das AuNPs. Os espectros obtidos encontram-se apresentados na **Figura 5.40**.



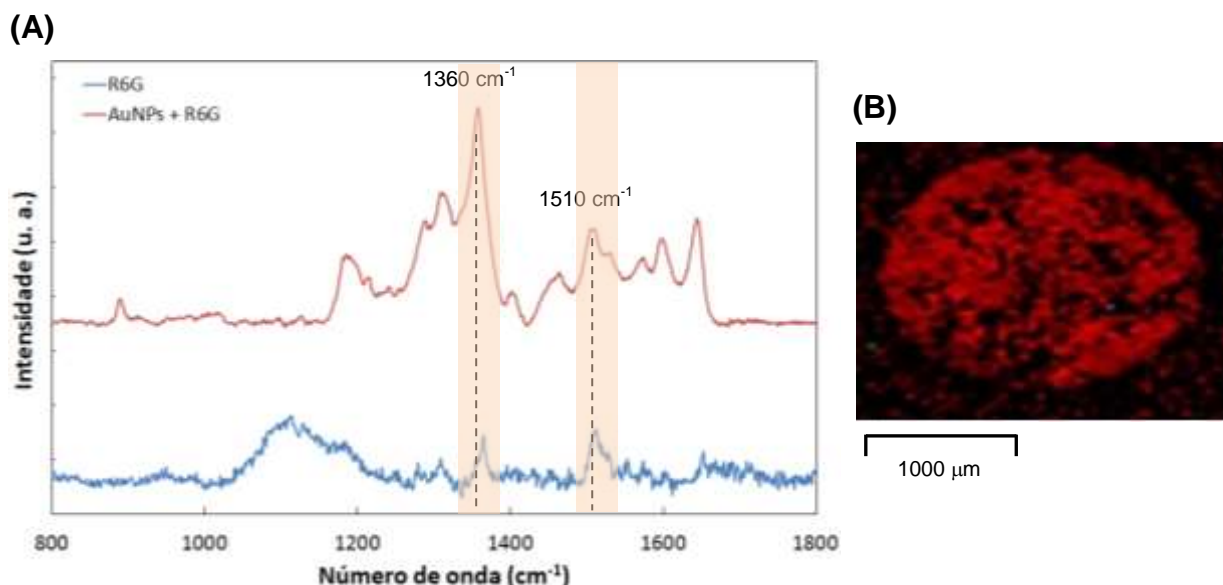
**Figura 5.40:** Comparação entre os espectros Raman do papel Whatman com e sem as AuNPs formadas.

Tal como era expectável, a análise dos quatro espectros representados acima permite verificar que a síntese de AuNPs no papel por redução com a glucose não é passível de ser detetada pela técnica de Espetroscopia Raman, uma vez que todas as bandas detetadas são características das ligações químicas da celulose que constitui as fibras do papel <sup>[114, 116]</sup>, não sendo introduzidas quaisquer alterações resultantes da formação das AuNPs.

No entanto, a presença de AuNPs no papel pode ser comprovada com base no efeito SERS: se se verificar uma intensificação do sinal de Raman após a molécula utilizada como analito adsorver à superfície do papel com as AuNPs (superfície SERS-ativa), então é possível concluir que esta tem de facto AuNPs.

Neste caso, utilizou-se a rodamina 6G (R6G) (*Sigma-Aldrich*) como sonda SERS devido aos seus intensos e facilmente distinguíveis sinais de Raman <sup>[121, 122]</sup>. Foram depositados no papel Whatman nº1 com as AuNPs 2 µL de uma solução de R6G com uma concentração de  $1 \times 10^{-6}$  M, enquanto que uma solução de R6G com uma concentração de  $1 \times 10^{-3}$  M foi utilizada no vidro, funcionando como controlo de referência. Embora fosse mais intuitivo utilizar como referência o papel Whatman sem as AuNPs, a utilização do vidro foi motivada pela necessidade de ter uma superfície não absorvente que possibilite a obtenção e posterior visualização dos sinais de Raman da R6G. De referir ainda que os sinais de SERS foram analisados utilizando um *laser* com um comprimento de onda de 632,81 nm.

Os espectros SERS obtidos para a R6G no vidro e para a R6G no papel com as AuNPs encontram-se representados na **Figura 5.41A**.



**Figura 5.41:** (A) Espectros Raman relativos à R6G no vidro utilizado como referência (a azul) e à R6G no papel com as AuNPs (a vermelho), sendo possível observar uma clara amplificação do sinal, resultante do efeito SERS. As bandas identificadas correspondem às vibrações associadas à R6G; (B) Mapa de distribuição de moléculas de R6G (cor vermelha) em toda a área do poço no substrato de papel com as AuNPs. A intensidade da cor vermelha é proporcional à intensidade da linha de  $1510\text{ cm}^{-1}$  da R6G.

Analisando os espectros apresentados, é possível observar uma clara intensificação do sinal de Raman correspondente à R6G no papel com as AuNPs em comparação com o sinal obtido para a R6G no vidro, utilizado como substrato de referência não plasmônico. Esta amplificação de sinal resulta portanto do efeito SERS associado à presença das AuNPs no papel, que o transformam numa superfície SERS-ativa à qual as moléculas de R6G adsorvem.

É possível identificar em ambos os espectros duas bandas características por volta de  $1360$  e  $1510\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes às vibrações associadas à R6G <sup>[121]</sup>. As áreas das referidas bandas foram utilizadas para calcular o fator de intensificação (do inglês EF – *Enhancement Factor*), através da equação:

$$EF = \frac{I_{SERS} \times N_{Raman}}{I_{Raman} \times N_{SERS}} \quad Eq. 5.2$$

onde  $I_{SERS}$  e  $I_{Raman}$  se referem respetivamente à intensidade SERS de uma determinada banda do analito (R6G) no espectro SERS e à intensidade da mesma banda no espectro Raman normal (não amplificado). Já  $N_{SERS}$  e  $N_{Raman}$  dizem respeito ao número de moléculas que contribuem respetivamente para o sinal SERS e para o sinal Raman de referência, sendo estes valores estimados com base na concentração do analito utilizado e no volume da amostra sobre a qual o *laser* incide para a obtenção dos espectros <sup>[121, 123, 124]</sup>.

Obteve-se então um EF médio de  $(4,6 \pm 2,6) \times 10^4$  para a banda de  $1360\text{ cm}^{-1}$  e um EF médio de  $(1,6 \times 10^4) \pm (3,8 \times 10^3)$  para a banda de  $1510\text{ cm}^{-1}$ , o que corresponde a uma amplificação considerável do sinal de Raman provocada pelo efeito SERS.

A **Figura 5.41B** permite ainda observar um mapa de distribuição de moléculas de R6G em toda a área do poço no substrato de papel com as AuNPs, sendo a intensidade da cor vermelha proporcional à intensidade da linha de  $1510\text{ cm}^{-1}$  da R6G <sup>[121]</sup>.

### 5.7. Fabricação do dispositivo final

Sendo o biossensor de papel proposto para aplicação em testes POC, é absolutamente essencial que o mesmo seja intuitivo, fácil de usar e acessível a pessoas não especializadas. Assim, com base nas otimizações efetuadas anteriormente, procedeu-se ao desenvolvimento de um protótipo do dispositivo final para deteção e quantificação de glucose.

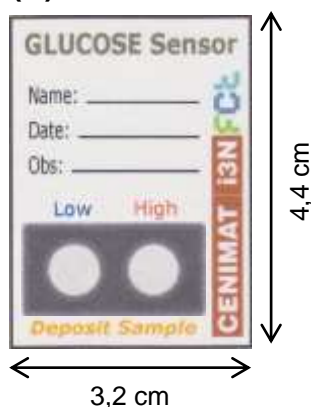
Na **Figura 5.42A** encontram-se representadas as diferentes camadas que constituem o sensor desenvolvido: os poços da camada intermédia possuem um diâmetro de 8 mm antes de serem difundidos, ficando com 7 mm depois da difusão. No que diz respeito às camadas de encapsulamento, estas foram impressas após a secagem dos reagentes depositados, não necessitando de ser difundidas.

A **Figura 5.42B** mostra o dispositivo final depois de encapsulado: o poço da esquerda corresponde às baixas concentrações de glucose (calibração da **Figura 5.34A**), enquanto o da direita está associado às concentrações mais elevadas (calibração da **Figura 5.34B**).

(A)



(B)



**Figura 5.42:** Protótipo do sensor colorimétrico não enzimático em papel desenvolvido: **(A)** Identificação das diferentes camadas que o constituem; **(B)** Sensor final e suas respectivas dimensões reais.

Relativamente ao volume de reagentes a utilizar, o mesmo foi definido como sendo o volume mínimo necessário para que os reagentes se espalhem por quase toda a área delimitada pelas barreiras hidrofóbicas (optou-se por não se preencher a área total dos poços de forma a minimizar o efeito de *coffee ring*). Assim, foram depositados 2,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{HAuCl}_4$  (0,01 M) em cada um dos poços e 2,5  $\mu\text{L}$  de NaOH (0,25 M no poço “Low” e 0,5 M no poço “High”).

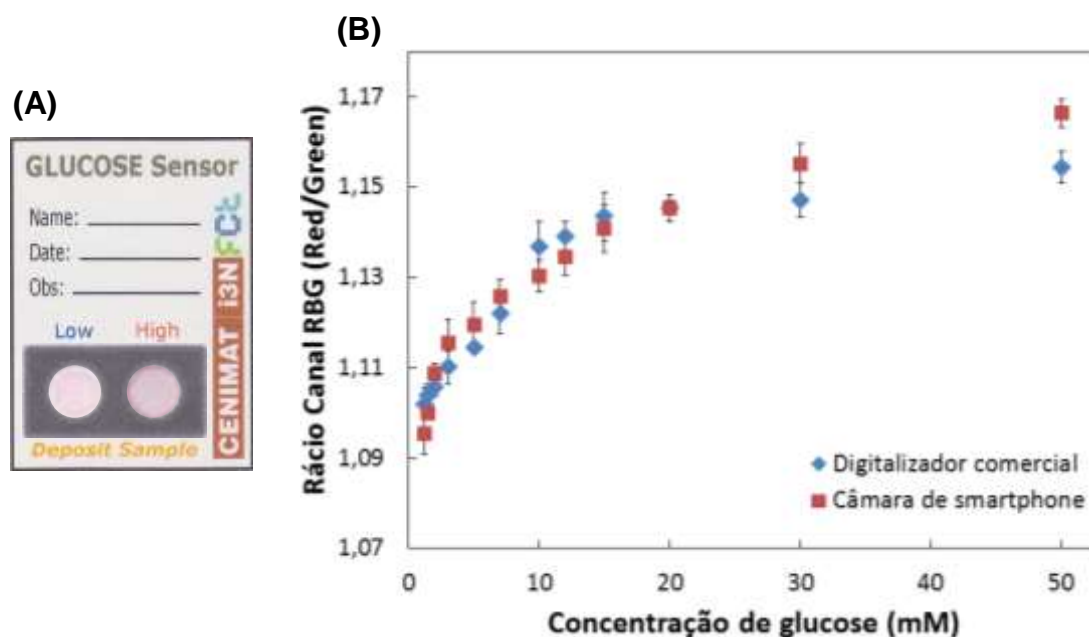
### 5.7.1. Análise Digital

Uma vez concluído o seu processo de fabricação, os dispositivos desenvolvidos foram testados utilizando 12 soluções de glucose com diferentes concentrações (1,25 – 50 mM).

A **Figura 5.43A** ilustra os resultados dos ensaios colorimétricos efetuados utilizando duas soluções de glucose com concentrações extremas: uma concentração hipoglicémica (1,25 mM) no poço “Low” e uma concentração hiperglicémica (50 mM) no poço “High”. As alterações colorimétricas são evidentes, observando-se, tal como era expectável, uma maior intensidade da cor vermelha no poço correspondente à concentração mais elevada de glucose.

Para além da análise visual, os sensores em questão foram também sujeitos a uma análise RGB com o propósito de estabelecer uma comparação entre os resultados obtidos com recurso a um digitalizador comercial e através de uma câmara de *smartphone*. Foram efetuados triplicados do teste para cada uma das concentrações de glucose consideradas, sendo posteriormente calculadas as respetivas médias e desvios-padrão. Para a aquisição das imagens foi utilizado um digitalizador *Canon PIXMA MG5250* e um *smartphone Huawei P9* com uma câmara fotográfica de 12 megapixels.

Os resultados referentes à análise RGB efetuada encontram-se representados no gráfico da **Figura 5.43B**.



**Figura 5.43:** (A) Ilustração dos resultados obtidos com o sensor de glucose encapsulado, utilizando uma concentração hipoglicémica (poço “Low”) e outra hiperglicémica (poço “High”); (B) Comparação entre a análise RGB dos resultados digitalizados com um digitalizador comercial e dos obtidos através de uma câmara de *smartphone*.

Observando o gráfico acima é possível verificar que existe uma grande semelhança entre os resultados obtidos por ambos os métodos, o que permite atestar a validade dos mesmos, fazendo com que representem duas alternativas viáveis na análise digital dos sensores colorimétricos desenvolvidos. No entanto, é importante referir que sobretudo no que diz respeito às imagens adquiridas através de *smartphone* existem vários fatores que podem influenciar os resultados obtidos, nomeadamente a qualidade da câmara fotográfica, a distância entre a câmara e o sensor ou as condições de iluminação do local onde é feita a aquisição.

### 5.7.2. Análise de Custos

Sendo o baixo custo associado aos biossensores em papel uma das principais razões da sua crescente utilização em testes de diagnóstico POC, considerou-se pertinente realizar a análise de custos do sensor de papel desenvolvido ao longo do presente trabalho.

Na **Tabela 5.1** encontram-se discriminados os custos dos materiais e reagentes necessários para a construção do dispositivo em questão. É importante referir que na análise efetuada não foram considerados os gastos de eletricidade dos equipamentos utilizados no processo de impressão e difusão dos padrões de cera no papel (impressora de cera e placa de aquecimento). Da mesma forma, também não está incluída a água desionizada utilizada na preparação das soluções dos reagentes usados. Para além disso, e sendo o sensor em questão encapsulado, foram consideradas três impressões (poços, encapsulamento da frente e do verso) com a área total do dispositivo, o que se revela uma estimativa por excesso sobretudo no caso da impressão dos poços.

**Tabela 5.1:** Custos de produção do sensor de papel desenvolvido para a deteção de glucose.

Material		Quantidade	Custo	Custo/sensor
Papel Whatman nº1 (GE Healthcare)		32 x 44 mm <sup>2</sup>	5,30 €/m <sup>2</sup>	7,46 x 10 <sup>-3</sup> €
Cera de impressão		3 x (32 x 44) mm <sup>2</sup>	0,28 €/m <sup>2</sup>	1,18 x 10 <sup>-3</sup> €
Reagentes	Ácido tetracloreáurico (HAuCl <sub>4</sub> )	5 µL = 1,97 mg	61,92 €/g	0,122 €
	Hidróxido de sódio (NaOH)	5 µL = 0,075 mg	51,78 €/kg	3,88 x 10 <sup>-6</sup> €
<b>TOTAL</b>		<b>0,131 €</b>		

O biossensor de papel desenvolvido apresenta portanto um custo total de aproximadamente 13,1 cêntimos por unidade, sendo os custos apresentados sobre o valor dos produtos adquiridos em pequenas quantidades. No entanto, a aquisição de quantidades industriais, assim como o estabelecimento de eventuais contratos com as empresas fornecedoras, permitiriam obter um custo por sensor ainda mais baixo do que o apresentado na **Tabela 5.1**.

## Capítulo 6

### 6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

O principal objetivo da presente dissertação consistiu no desenvolvimento de um biossensor colorimétrico não enzimático em papel para deteção e quantificação dos níveis de glucose em testes *point-of-care*, constituindo uma alternativa aos suportes enzimáticos já existentes devido ao seu baixo custo e à maior estabilidade apresentada. O princípio de funcionamento do sensor desenvolvido baseia-se na síntese de AuNPs por redução de um sal de ouro ( $\text{HAuCl}_4$ ) com a glucose. A variação da concentração do agente redutor resulta na formação de NPs com diferentes tamanhos, às quais estão associadas alterações de cor do sensor.

Desta forma, procedeu-se em primeiro lugar à realização de um estudo em solução com o objetivo de atestar a validade do referido método, utilizando diferentes concentrações de glucose (1,25 – 50 mM). Observou-se que para baixas concentrações de glucose as soluções apresentavam uma cor azul/púrpura, enquanto para concentrações hiperglicémicas adquiriam uma cor rosa/avermelhada. Estas alterações de cor encontram-se associadas ao deslocamento da ressonância plasmónica de superfície para comprimentos de onda mais pequenos na região visível do espetro eletromagnético à medida que se aumenta a concentração de glucose utilizada no processo de síntese das AuNPs. Para além disso, a caracterização por TEM permitiu ainda relacionar a cor das soluções com o tamanho das AuNPs formadas: a cor azul corresponde a NPs de maiores dimensões, enquanto partículas mais pequenas estão associadas à presença da cor avermelhada.

A rapidez, simplicidade e sensibilidade dos ensaios colorimétricos efetuados em solução motivaram a sua aplicação num substrato sólido, constituindo o papel um ótimo suporte neste tipo de métodos de deteção devido ao seu baixo custo, abundância, disponibilidade, biodegradabilidade e facilidade de eliminação por incineração evitando contaminações. Para além disso, a sua cor branca proporciona um elevado contraste facilitando a visualização e a análise dos resultados colorimétricos obtidos. Neste trabalho foram caracterizados (estrutural, química e morfológicamente) e testados três tipos de papel: papel Whatman nº1, papel de fotocópia e papel mata-borrão. No entanto, o tipo de papel escolhido como suporte para o desenvolvimento do sensor em questão foi o papel Whatman, não só pelas suas propriedades (espessura adequada, poroso, hidrofílico e sem componentes adicionais na sua composição) mas também por ter sido aquele que garantiu uma melhor interação com os reagentes envolvidos no processo de deteção de glucose.

A construção dos sensores foi efetuada recorrendo à tecnologia *Lab-on-Paper*, que consiste na definição de zonas de teste hidrofílicas no papel, delimitadas por regiões hidrofóbicas formadas pela impressão e difusão de uma camada de cera. Embora o processo de difusão da cera envolva o aquecimento do substrato de papel a uma temperatura de 120 °C

durante cerca de 1 a 2 minutos, as análises térmicas realizadas permitiram concluir que este é termicamente estável até aos 320 °C, não sofrendo por isso transformações consideráveis quando submetido a temperaturas inferiores a esta.

Várias concentrações de cada um dos reagentes foram utilizadas no processo de otimização do método de deteção colorimétrico considerado. A avaliação da cor resultante dos ensaios colorimétricos foi efetuada com recurso ao *ImageJ*, um *software* de edição e análise de imagem que permite calcular as intensidades médias dos canais RGB de uma determinada zona de teste. Com base nos rácios entre as intensidades dos canais *Red* e *Green* obtiveram-se duas retas de calibração dos sensores de papel desenvolvidos, correspondentes a duas zonas de teste no sensor final, revelando-se uma delas sensível às baixas concentrações de glucose (1,5 – 6 mM) e a outra às concentrações mais elevadas (7 – 30 mM). As duas retas de calibração obtidas apresentam uma grande complementaridade, uma vez que a reta referente às baixas concentrações de glucose apresenta um rácio máximo de 1,057 (correspondente a uma concentração de 6 mM), enquanto que a reta associada às concentrações mais elevadas possui um rácio mínimo de 1,059 (correspondente a uma concentração de 7 mM). Deste modo, a possibilidade de obter resultados ambíguos é eliminada, dado que qualquer valor do rácio calculado se encontra associado apenas a uma das duas retas de calibração, não existindo nenhum valor comum a ambas. Esta complementaridade permite assim determinar quantitativamente a concentração de glucose em amostras nas quais esta seja desconhecida, associando em primeiro lugar a amostra em questão a uma das duas retas de calibração de acordo com o valor do rácio *Red/Green* obtido a partir da análise colorimétrica efetuada e utilizando posteriormente a respetiva equação da reta para determinar a concentração de glucose da amostra.

A presença de AuNPs no papel, resultantes da redução do  $\text{HAuCl}_4$  pela glucose, foi também comprovada com recurso a diferentes técnicas de caracterização estrutural, química e morfológica, nomeadamente a SEM-EDS, a DRX e a Espectroscopia Raman.

Por fim, foi avaliada a reprodutibilidade do sensor final, utilizando soluções aquosas de glucose com concentrações entre 1,25 e 50 mM. Os resultados dos ensaios colorimétricos realizados foram mais uma vez analisados através do *software ImageJ*. Para além disso, foi estabelecida uma comparação entre a análise RGB dos resultados digitalizados com recurso a um digitalizador e através de fotografia utilizando uma câmara de *smartphone*, tendo sido possível demonstrar que ambos os métodos constituem alternativas viáveis na análise digital dos sensores colorimétricos fabricados.

De um modo geral, os resultados obtidos permitem concluir que o sensor colorimétrico em papel desenvolvido revela bastante sensibilidade na determinação dos níveis de glucose em amostras, representando uma alternativa mais simples, rápida e apresentando um custo inferior aos dispositivos existentes atualmente com o mesmo propósito. Para além disso, a facilidade de incineração do papel torna possível a eliminação do sensor imediatamente após a sua utilização, evitando contaminações, o que constitui um aspeto absolutamente fundamental quando se trata de amostras de fluidos biológicos.



Contudo, existem alguns aspetos do sensor desenvolvido que podem ainda vir a ser explorados, com vista à sua otimização, tornando possível que o mesmo possa ser colocado à disposição de qualquer pessoa, sobretudo nos países em desenvolvimento onde os recursos materiais e humanos são ainda limitados e pouco especializados. Como tal, apresentam-se em seguida algumas sugestões e perspetivas futuras de aperfeiçoamento do referido sensor:

1. Explorar a possibilidade de criação de uma única zona de teste que apresente sensibilidade em toda a gama de concentrações fisiológicas de glucose, em alternativa às duas zonas de teste existentes no sensor desenvolvido, tornando a sua utilização mais intuitiva.

2. Testar outras possíveis geometrias para o dispositivo, em particular a fabricação de biossensores em formato 3D, com vista à otimização da coloração obtida nas zonas de teste.

3. Realização de testes de validação dos sensores desenvolvidos utilizando amostras reais de fluidos biológicos (ex: sangue, soro, urina, etc.) e comparação dos resultados obtidos com os dos ensaios efetuados em equipamentos convencionais.

4. Criação de uma aplicação para *smartphone* que a partir de uma simples fotografia e com base nas retas de calibração apresentadas anteriormente permita efetuar uma análise quantitativa, convertendo automaticamente a cor observada nas zonas de teste do biossensor num valor numérico de concentração de glucose.

5. A utilização de algoritmos de *machine learning* na análise colorimétrica dos resultados obtidos através de um *smartphone* seria também um ponto interessante a explorar futuramente. O *machine learning* é um método de análise de dados que automatiza o desenvolvimento de modelos analíticos usando algoritmos que aprendem iterativamente a partir de dados, sem intervenção humana, isto é, sem que sejam explicitamente programados para procurar algo específico, adaptando-se de forma independente a novos dados. Recentemente foi proposta a utilização de algoritmos de *machine learning* na análise colorimétrica de tiras de teste de pH com diferentes valores e em diferentes formatos de imagem <sup>[125]</sup>. A utilização destes sistemas inteligentes no desenvolvimento de uma aplicação para *smartphone* capaz de analisar o biossensor desenvolvido representaria uma mais-valia, permitindo fazer face a fatores como a qualidade da câmara ou as condições de iluminação, suscetíveis de influenciar os resultados obtidos.



## Capítulo 7

### 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides and E. Carrilho, "Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices", *Analytical Chemistry*, vol. 82, no. 1, pp. 3–10, 2010.
- [2] N. F. de O. Correia, "Produção e caracterização de dispositivos electrocrômicos em substratos à base de celulose", M. S. Thesis, DCM, FCT-UNL, Monte de Caparica, PT, 2008.
- [3] J. L. Velho, *Mineral Fillers for Paper: Why, What, How* - 1st Edition. Tomar: Tecnicelipa, 2003.
- [4] M. Zhou, M. Yang and F. Zhou, "Paper based colorimetric biosensing platform utilizing cross-linked siloxane as probe", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 55, pp. 39–43, 2014.
- [5] J. C. Roberts, *The Chemistry of Paper*. The Royal Society of Chemistry, 1996.
- [6] J. Hu *et al.*, "Advances in paper-based point-of-care diagnostics", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 54, pp. 585–97, 2014.
- [7] A. K. Yetisen, M. S. Akram and C. R. Lowe, "Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices", *Lab on a Chip*, vol. 13, no. 12, pp. 2210–51, 2013.
- [8] D. Klemm, H.-P. Schmauder and T. Heinze, "Cellulose", in *Biopolymers Online*, John Wiley & Sons Inc., 2005, ch. 6, pp. 275–87.
- [9] Da floresta ao papel, "A celulose". [Online]. Available: [www.daflorestaapapel.com/p5/](http://www.daflorestaapapel.com/p5/). [Accessed: 23-Feb-2017].
- [10] M. N. Costa, "Desenvolvimento de microfluídica em papel para utilização em biossensores", M. S. Thesis, DCM, FCT-UNL, Monte de Caparica, PT, 2012.
- [11] W. Dungchai, O. Chailapakul and C. S. Henry, "Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices", *Analytica Chimica Acta*, vol. 674, no. 2, pp. 227–33, 2010.
- [12] C. Parolo and A. Merkoçi, "Paper-based nanobiosensors for diagnostics", *Chemical Society Reviews*, vol. 42, no. 2, pp. 450–7, 2013.
- [13] A. M. López-Marzo and A. Merkoçi, "Paper-based sensors and assays: a success of the engineering design and the convergence of knowledge areas", *Lab on a Chip*, vol. 16, no. 17, pp. 3150–76, 2016.
- [14] J. Jacob, "Desenvolvimento de placas de microtitulação em papel", M. S. Thesis, DCM, FCT-UNL, Monte de Caparica, PT, 2013.
- [15] R. Pelton, "Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 28, no. 8, pp. 925–42, 2009.
- [16] G. A. Posthuma-Trumpie, J. Korf and A. Van Amerongen, "Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 393, no. 2, pp. 569–82, 2009.

- [17] D. Morrison, M. Dokmeci, U. Demirci and A. Khademhosseini, "Clinical Applications of Micro- and Nanoscale Biosensors", in *Biomedical Nanostructures*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons Inc., 2008, ch. 17, pp. 433–58.
- [18] C. Zhao and X. Liu, "A portable paper-based microfluidic platform for multiplexed electrochemical detection of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus antibodies in serum", *Biomicrofluidics*, vol. 10, no. 2, 2016.
- [19] A. C. Marques *et al.*, "Office Paper Platform for Bioelectrochromic Detection of Electrochemically Active Bacteria using Tungsten Trioxide Nanoprobes", *Scientific Reports*, vol. 5, no. 9910, 2015.
- [20] G. A. Suaifan, S. Alhogail and M. Zourob, "Paper-based magnetic nanoparticle-peptide probe for rapid and quantitative colorimetric detection of Escherichia coli O157:H7", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 92, pp. 702–8, 2016.
- [21] T. Vo-Dinh and B. Cullum, "Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics", *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, vol. 366, no. 6–7, pp. 540–51, 2000.
- [22] J. Yu, L. Ge, J. Huang, S. Wang and S. Ge, "Microfluidic paper-based chemiluminescence biosensor for simultaneous determination of glucose and uric acid", *Lab on a Chip*, vol. 11, no. 7, pp. 1286–91, 2011.
- [23] R. C. Wong and H. Y. Tse, *Lateral Flow Immunoassay*. Totowa, NJ: Humana Press, 2009.
- [24] K. Kiilerich-Pedersen, C. R. Poulsen, J. Daprà, N. O. Christiansen and N. Rozlosnik, "Polymer Based Biosensors for Pathogen Diagnostics", in *Environmental Biosensors*, V. Somerset (Ed.), InTech, 2011, ch. 9, pp. 193–212.
- [25] M. N. Costa *et al.*, "A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: lab-on-paper", *Nanotechnology*, vol. 25, no. 9, 2014.
- [26] B. Veigas *et al.*, "Gold on paper – paper platform for Au-nanoprobe TB detection", *Lab on a Chip*, vol. 12, no. 22, pp. 4802–8, 2012.
- [27] A. W. Martinez *et al.*, "Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis", *Analytical Chemistry*, vol. 80, no. 10, pp. 3699–707, 2008.
- [28] H. J. Chun, Y. M. Park, Y. D. Han, Y. H. Jang and H. C. Yoon, "Paper-based glucose biosensing system utilizing a smartphone as a signal reader", *Biochip Journal*, vol. 8, no. 3, pp. 218–26, 2014.
- [29] MD.SAÚDE, "Exame de urina", 2017. [Online]. Available: [www.mdsaude.com/2009/08/exame-de-urina.html](http://www.mdsaude.com/2009/08/exame-de-urina.html). [Accessed: 23-Feb-2017].
- [30] M. Sajid, A. N. Kawde and M. Daud, "Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review", *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 19, no. 6, pp. 689–705, 2015.
- [31] E. M. Fenton, M. R. Mascarenas, G. P. López and S. S. Sibbett, "Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping", *ACS Applied Material & Interfaces*, vol. 1, no. 1, pp. 124–9, 2009.
- [32] W. Wang, W.-Y. Wu, W. Wang and J. J. Zhu, "Three-shaped paper strip for semiquantitative colorimetric detection of protein with self-calibration", *Journal of Chromatography A*, vol. 1217, no. 24, pp. 3896–9, 2010.

- [33] C. Z. Li *et al.*, “Paper based point-of-care testing disc for multiplex whole cell bacteria analysis”, *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 26, no. 11, pp. 4342–8, 2011.
- [34] F. Liu *et al.*, “Multiplex detection and genotyping of pathogenic bacteria on paper-based biosensor with a novel universal primer mediated asymmetric PCR”, *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 74, pp. 778–85, 2015.
- [35] Cytodiagnostics, “Lateral Flow Immunoassays”. [Online]. Available: [www.cytodiagnostics.com/store/pc/Lateral-Flow-Immunoassays-d6.htm](http://www.cytodiagnostics.com/store/pc/Lateral-Flow-Immunoassays-d6.htm). [Accessed: 26-Jul-2017].
- [36] H. Bruus, *Theoretical Microfluidics*. New York, USA: Oxford University Press Inc., 2008.
- [37] H. L. L. Yu, C. M. Montesa, N. R. L. Rojas and E. P. Enriquez, “Nucleic-acid based lateral flow strip biosensor via competitive binding for possible dengue detection”, *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 3, no. 5, pp. 1–6, 2012.
- [38] S. A. Klasner *et al.*, “Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 397, no. 5, pp. 1821–9, 2010.
- [39] News & Analysis, “Inkjet printing of ‘paperfluidic’ devices”, *Bioanalysis*, vol. 2, no. 9, pp. 1531–3, 2010.
- [40] C. Dincer, R. Bruch, A. Kling, P. S. Dittrich and G. A. Urban, “Multiplexed Point-of-Care Testing – xPOCT”, *Trends in Biotechnology*, 2017.
- [41] G. G. Lewis, M. J. DiTucci, M. S. Baker and S. T. Phillips, “High throughput method for prototyping three-dimensional, paper-based microfluidic devices”, *Lab on a Chip*, vol. 12, no. 15, pp. 2630–3, 2012.
- [42] A. W. Martinez, S. T. Phillips and G. M. Whitesides, “Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape”, *PNAS*, vol. 105, no. 50, pp. 19606–11, 2008.
- [43] H. Liu and R. M. Crooks, “Three-dimensional paper microfluidic devices assembled using the principles of origami”, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, no. 44, pp. 17564–66, 2011.
- [44] S. J. Vella *et al.*, “Measuring Markers of Liver Function Using a Micropatterned Paper Device Designed for Blood from a Fingertick”, *Analytical Chemistry*, vol. 84, pp. 2883–91, 2012.
- [45] L. Ge *et al.*, “Three-dimensional paper-based electrochemiluminescence immunodevice for multiplexed measurement of biomarkers and point-of-care testing”, *Biomaterials*, vol. 33, no. 4, pp. 1024–31, 2012.
- [46] E. Carrilho, A. W. Martinez and G. M. Whitesides, “Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics”, *Analytical Chemistry*, vol. 81, no. 16, pp. 7091–5, 2009.
- [47] E. Carrilho, S. T. Phillips, S. J. Vella, A. W. Martinez and G. M. Whitesides, “Paper microzone plates”, *Analytical Chemistry*, vol. 81, no. 15, pp. 5990–8, 2009.
- [48] “Nanotechnology”. [Online]. Available: <https://en.wikipedia.org/wiki/Nanotechnology>. [Accessed: 25-Feb-2017].
- [49] M. A. Martins and T. Trindade, “Nanomaterials and the discovery of new worlds at the chemist’s bench”, *Química Nova*, vol. 35, no.7, pp. 1434–46, 2012.

- [50] L. Williams and W. Adams, *Nanotechnology Demystified*. The McGraw-Hill Companies Inc., 2006.
- [51] C. Buzea, I. I. Pacheco and K. Robbie, “Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity”, *Biointerphases*, vol. 2, no. 4, pp. 17–71, 2007.
- [52] E. Roduner, “Size matters: why nanomaterials are different”, *Chemical Society Reviews*, vol. 35, no. 7, pp. 583–92, 2006.
- [53] M. A. El-Sayed, “Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes”, *Accounts of Chemical Research*, vol. 34, no. 4, pp. 257–64, 2001.
- [54] J. Santos *et al.*, “Localized surface plasmon resonance applied to biosensors and solar cells”, *Química Nova*, vol. 39, no. 9, pp. 1098–111, 2016.
- [55] L. M. Liz-Marzán, “Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles”, *Langmuir*, vol. 22, no. 1, pp. 32–41, 2006.
- [56] K. S. Lee and M. A. El-Sayed, “Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition”, *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, no. 39, pp. 19220–5, 2006.
- [57] K. S. Lee and M. A. El-Sayed, “Dependence of the enhanced optical scattering efficiency relative to that of absorption for gold metal nanorods on aspect ratio, size, end-cap shape, and medium refractive index”, *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, no. 43, pp. 20331–8, 2005.
- [58] M. C. Daniel and D. Astruc, “Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology”, *Chemical Reviews*, vol. 104, no. 1, pp. 293–346, 2004.
- [59] K. J. Klabunde, “Nanoscale Materials in Chemistry”, in *Wiley Interscience*, John Wiley & Sons Inc., 2001, ch. 5, pp. 121–67.
- [60] M. Larginho and P. V. Baptista, “Gold and silver nanoparticles for clinical diagnostics – From genomics to proteomics”, *Journal of Proteomics*, vol. 75, no. 10, pp. 2811–23, 2012.
- [61] C. S. Thaxton, D. G. Georganopoulou and C. A. Mirkin, “Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets”, *Clinica Chimica Acta*, vol. 363, no. 1–2, pp. 120–6, 2006.
- [62] B. Veigas, “Au-Nanossondas – Aplicação na deteção de *Mycobacterium tuberculosis* e *Plasmodium berghei*”, M. S. Thesis, DCM, FCT-UNL, Monte de Caparica, PT, 2009.
- [63] P. Baptista *et al.*, “Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 391, no. 3, pp. 943–50, 2008.
- [64] J. Kimling *et al.*, “Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited”, *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, no. 32, pp. 15700–7, 2006.
- [65] P. Zhao, N. Li and D. Astruc, “State of the art in gold nanoparticle synthesis”, *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 257, no. 3–4, pp. 638–65, 2013.
- [66] P. Raveendran, J. Fu and S. L. Wallen, “A simple and “green” method for the synthesis of Au, Ag, and Au-Ag alloy nanoparticles”, *Green Chemistry*, vol. 8, no. 1, pp. 34–8, 2006.
- [67] P. Raveendran, J. Fu and S. L. Wallen, “Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles”, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 125, no. 46, pp. 13940–1, 2003.

- [68] S. Unser, I. Campbell, D. Jana and L. Sagle, "Direct glucose sensing in the physiological range through plasmonic nanoparticle formation", *Analyst*, vol. 140, no. 2, pp. 590–9, 2015.
- [69] L. Guo *et al.*, "Strategies for enhancing the sensitivity of plasmonic nanosensors", *Nano Today*, vol. 10, no. 2, pp. 213–39, 2015.
- [70] "Glucose". [Online]. Available: <https://en.wikipedia.org/wiki/Glucose>. [Accessed: 27-Feb-2017].
- [71] S. Liu, W. Su and X. Ding, "A Review on Microfluidic Paper-Based Analytical Devices for Glucose Detection", *Sensors*, vol. 16, no. 12, pp. 2086–3002, 2016.
- [72] H. C. Wang and A. R. Lee, "Recent developments in blood glucose sensors", *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 23, no. 2, pp. 191–200, 2014.
- [73] BBC, "Saúde diabetes", 2016. [Online]. Available: [www.bbc.com/portuguese/noticias/2016/04/160406\\_diabetes\\_aumento\\_lab](http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2016/04/160406_diabetes_aumento_lab). [Accessed: 27-Feb-2017].
- [74] C. M. Mendes, "Dispara o número de novos casos de diabetes", *Destak*, Mar. 19, 2017.
- [75] N. S. Oliver, C. Toumazou, A. E. G. Cass and D. G. Johnston, "Glucose sensors: a review of current and emerging technology", *Diabetic Medicine*, vol. 26, no. 3, pp. 197–210, 2009.
- [76] S. K. Vashist, "Continuous Glucose Monitoring Systems: A Review", *Diagnostics*, vol. 3, pp. 385–412, 2013.
- [77] D. Rodbard, "Continuous Glucose Monitoring Systems: A Review of Successes, Challenges and Opportunities", *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 18, no. 2, pp. 3–13, 2016.
- [78] Texas Diabetes & Endocrinology, "Benefits of Continuous Glucose Monitors (CGMs)", 2016. [Online]. Available: [www.texasdiabetes.com/benefits-of-continuous-glucose-monitors-cgms/](http://www.texasdiabetes.com/benefits-of-continuous-glucose-monitors-cgms/). [Accessed: 28-Feb-2017].
- [79] T. Koschinsky and L. Heinemann, "Sensors for glucose monitoring: technical and clinical aspects", *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, vol. 17, no. 2, pp. 113–23, 2001.
- [80] K. M. Schilling, A. L. Lepore, J. A. Kurian and A. W. Martinez, "Fully enclosed microfluidic paper-based analytical devices", *Analytical Chemistry*, vol. 84, no. 3, pp. 1579–85, 2012.
- [81] X. Chen *et al.*, "Determination of glucose and uric acid with bienzyme colorimetry on microfluidic paper-based analysis devices", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 35, no. 1, pp. 363–8, 2012.
- [82] S. Suvarna *et al.*, "Synthesis of a novel glucose capped gold nanoparticle as a better theranostic candidate", *PLoS One*, vol. 12, no. 6, 2017.
- [83] "Ultraviolet visible spectroscopy". [Online]. Available: [https://en.wikipedia.org/wiki/Ultraviolet%E2%80%93visible\\_spectroscopy](https://en.wikipedia.org/wiki/Ultraviolet%E2%80%93visible_spectroscopy). [Accessed: 12-Sep-2017].
- [84] S. L. Upstone, "Ultraviolet/Visible Light Absorption Spectrophotometry in Clinical Chemistry", in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Inc., 2006.
- [85] K. D. Vernon-Parry, "Scanning electron microscopy: an introduction", *III-Vs Review*, vol. 13, no. 4, pp. 40–4, 2006.

- [86] SERC, “Scanning Electron Microscopy (SEM)”. [Online]. Available: [http://serc.carleton.edu/research\\_education/geochemsheets/techniques/SEM.html](http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html). [Accessed: 17-Feb-2017].
- [87] A. Gonçalves, “Desenvolvimento de testes de diagnóstico utilizando tecnologia *Lab-on-Paper*”, M. S. Thesis, DCM, FCT-UNL, Monte de Caparica, PT, 2015.
- [88] “Transmission Electron Microscopy”. [Online]. Available: [https://en.wikipedia.org/wiki/Transmission\\_electron\\_microscopy](https://en.wikipedia.org/wiki/Transmission_electron_microscopy). [Accessed: 17-Feb-2017].
- [89] R. F. Egerton, *Physical Principles of Electron Microscopy*. New York, USA: Springer-Verlag, 2005.
- [90] J. Goldstein *et al.*, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. New York, USA: Springer Science+Business Media, 2003.
- [91] SERC, “X-ray Powder Diffraction (XRD)”. [Online]. Available: [http://serc.carleton.edu/research\\_education/geochemsheets/techniques/XRD.html](http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/XRD.html). [Accessed: 19-Feb-2017].
- [92] C. Hammond, *The Basics of Crystallography and Diffraction* - 4th Edition. Oxford, UK: Oxford University Press, 2015.
- [93] Thermo Fisher Scientific, “FTIR Basics”. [Online]. Available: [www.thermofisher.com/pt/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-basics.html](http://www.thermofisher.com/pt/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-basics.html). [Accessed: 19-Feb-2017].
- [94] Thermo Fisher Scientific, “FTIR Sample Techniques: Attenuated Total Reflection (ATR)”. [Online]. Available: [www.thermofisher.com/pt/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-attenuated-total-reflection-atr.html](http://www.thermofisher.com/pt/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-attenuated-total-reflection-atr.html). [Accessed: 19-Feb-2017].
- [95] PerkinElmer, “FT-IR Spectroscopy: Attenuated Total Reflectance. Technical Note”. [Online]. Available: [http://www.utsc.utoronto.ca/~traceslab/ATR\\_FTIR.pdf](http://www.utsc.utoronto.ca/~traceslab/ATR_FTIR.pdf). [Accessed: 15-Sep-2017].
- [96] “Dynamic Light Scattering”. [Online]. Available: [https://en.wikipedia.org/wiki/Dynamic\\_light\\_scattering](https://en.wikipedia.org/wiki/Dynamic_light_scattering). [Accessed: 15-Sep-2017].
- [97] HORIBA, “Dynamic Light Scattering”. [Online]. Available: [www.horiba.com/scientific/products/particle-characterization/technology/dynamic-light-scattering/](http://www.horiba.com/scientific/products/particle-characterization/technology/dynamic-light-scattering/). [Accessed: 21-Feb-2017].
- [98] “Raman spectroscopy”. [Online]. Available: [https://en.wikipedia.org/wiki/Raman\\_spectroscopy](https://en.wikipedia.org/wiki/Raman_spectroscopy). [Accessed: 18-Sep-2017].
- [99] “Raman spectroscopy”. [Online]. Available: [http://www.kosi.com/na\\_en/products/raman-spectroscopy/raman-technical-resources/raman-tutorial.php](http://www.kosi.com/na_en/products/raman-spectroscopy/raman-technical-resources/raman-tutorial.php). [Accessed: 18-Sep-2017].
- [100] T. Hatakeyama and F. X. Quinn, *Thermal Analysis: Fundamentals and Applications to Polymer Science* - 2nd Edition. Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons Inc., 1999.
- [101] “Thermogravimetric Analysis”. [Online]. Available: [https://en.wikipedia.org/wiki/Thermogravimetric\\_analysis](https://en.wikipedia.org/wiki/Thermogravimetric_analysis). [Accessed: 08-Jun-2017].



- [102] “Differential Scanning Calorimetry”. [Online]. Available: [https://en.wikipedia.org/wiki/Differential\\_scanning\\_calorimetry](https://en.wikipedia.org/wiki/Differential_scanning_calorimetry). [Accessed: 21-Feb-2017].
- [103] C. Schick, “Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 395, no. 6, pp. 1589–611, 2009.
- [104] L. Szcześniak, A. Rachocki and J. Tritt-Goc, “Glass transition temperature and thermal decomposition of cellulose powder”, *Cellulose*, vol. 15, no. 3, pp. 445–51, 2008.
- [105] “Contact Angle”. [Online]. Available: [https://en.wikipedia.org/wiki/Contact\\_angle](https://en.wikipedia.org/wiki/Contact_angle). [Accessed: 08-Jun-2017].
- [106] Y. Yuan and T. R. Lee, “Contact angle and wetting properties”, in *Surface Science Techniques, Springer Series in Surface Sciences*, Springer Berlin Heidelberg, 2013, vol. 51, pp. 3–34.
- [107] E. L. Decker, B. Frank, Y. Suo and S. Garoff, “Physics of contact angle measurements”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 156, no. 1–3, pp. 177–89, 1999.
- [108] C. Engelbrekt *et al.*, “Green synthesis of gold nanoparticles with starch–glucose and application in bioelectrochemistry”, *Journal of Materials Chemistry*, vol. 19, pp. 7839–47, 2009.
- [109] R. Chen, K. A. Jakes and D. W. Foreman, “Peak-fitting analysis of cotton fiber powder X-ray diffraction spectra”, *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 93, no. 5, pp. 2019–24, 2004.
- [110] E.-L. Hult, T. Iversen and J. Sugiyama, “Characterization of the supermolecular structure of cellulose in wood pulp fibres”, *Cellulose*, vol. 10, no. 2, pp. 103–10, 2003.
- [111] V. Tserki, N. E. Zafeiropoulos, F. Simon and C. Panayiotou, “A study of the effect of acetylation and propionylation surface treatments on natural fibres”, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, vol. 36, no. 8, pp. 1110–8, 2005.
- [112] N. Terinte, R. Ibbett and K. C. Schuster, “Overview on native cellulose and microcrystalline cellulose I structure studied by X-ray diffraction (WAXD): Comparison between measurement techniques”, *Lenzinger Berichte*, vol. 89, pp. 118–31, 2011.
- [113] S. Park, J. O. Baker, M. E. Himmel, P. A. Parilla and D. K. Johnson, “Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance”, *Biotechnology for Biofuels*, vol. 3, no. 10, 2010.
- [114] L. M. Proniewicz *et al.*, “FT-IR and FT-Raman study of hydrothermally degraded cellulose”, *Journal of Molecular Structure*, vol. 596, no. 1–3, pp. 163–9, 2001.
- [115] M. Jonoobi, A. P. Mathew, M. M. Abdi, M. D. Makinejad and K. Oksman, “A comparison of modified and unmodified cellulose nanofiber reinforced polylactic acid (PLA) prepared by twin screw extrusion”, *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 20, no. 4, pp. 991–7, 2012.
- [116] M. Sboui *et al.*, “Hybrid paper–TiO<sub>2</sub> coupled with a Cu<sub>2</sub>O heterojunction: an efficient photocatalyst under sun-light irradiation”, *Royal Society of Chemistry*, vol. 6, no. 90, pp. 86918–29, 2016.
- [117] Scientia Arca, “Análise de outliers”. [Online]. Available: <http://scientiaarca.com.br/analise-de-outliers-o-que-e-e-como-utilizar/>. [Accessed: 24-Jun-2017].
- [118] S. Yan *et al.*, “Synthesis of Au/C catalyst with high electrooxidation activity”, *Electrochimica Acta*, vol. 94, pp. 159–64, 2013.

- [119] M. Zhu *et al.*, “Branched Au nanostructures enriched with a uniform facet: facile synthesis and catalytic performances”, *Scientific Reports*, vol. 4, no. 5259, 2014.
- [120] B. Sharma, R. R. Frontiera, A.-I. Henry, E. Ringe and R. P. Van Duyne, “SERS: Materials, applications, and the future”, *Materials Today*, vol. 15, no. 1–2, pp. 16–25, 2012.
- [121] M. J. Oliveira *et al.*, “Office paper decorated with silver nanostars – an alternative cost effective platform for trace analyte detection by SERS”, *Scientific Reports*, vol. 7, no. 2480, 2017.
- [122] S. Shim, C. M. Stuart and R. A. Mathies, “Resonance Raman cross-sections and vibronic analysis of rhodamine 6G from broadband stimulated Raman spectroscopy”, *ChemPhysChem*, vol. 9, no. 5, pp. 697–9, 2008.
- [123] M. A. Mohiddon, L. D. V. Sangani and M. G. Krishna, “Scanning near field optical microscopy of gold nano-disc arrays fabricated by electron beam lithography and their application as surface enhanced Raman scattering substrates”, *Chemical Physics Letters*, vol. 588, pp. 160–6, 2013.
- [124] Y. Wang, S. Guo, H. Chen and E. Wang, “Facile fabrication of large area of aggregated gold nanorods film for efficient surface-enhanced Raman scattering”, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 318, no. 1, pp. 82–7, 2008.
- [125] A. Y. Mutlu *et al.*, “Smartphone-based colorimetric detection via machine learning”, *Analyst*, vol. 142, no. 13, pp. 2434–41, 2017.

## ANEXOS

### I – Comparação entre a posição do pico da banda SPR e o tempo de formação das AuNPs em solução para diferentes concentrações de glucose

**Tabela 0.1:** Comparação entre a posição do pico da banda SPR e o tempo de formação das AuNPs em solução para as diferentes concentrações de glucose testadas.

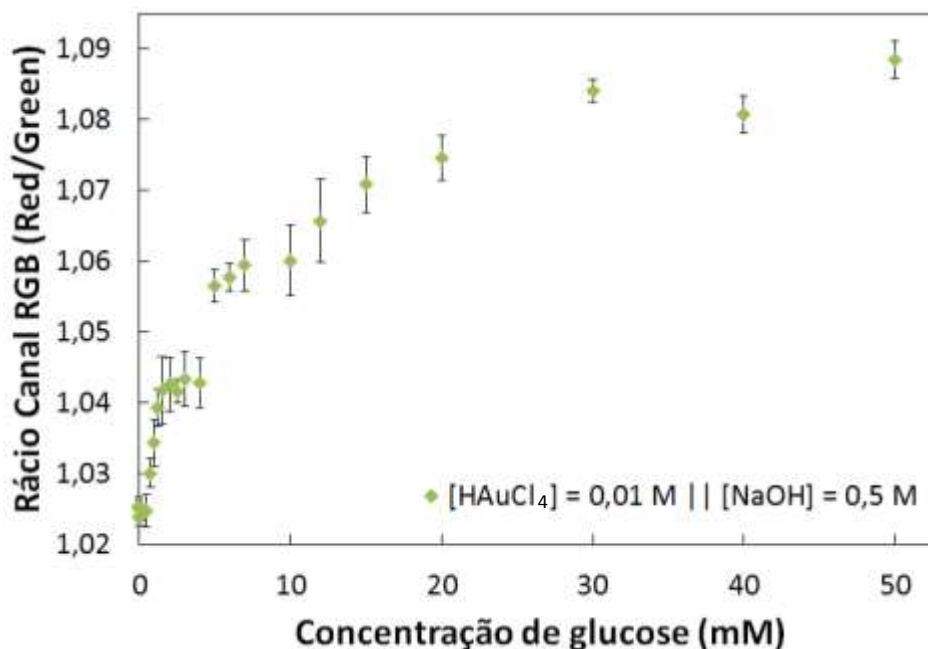
Concentração de glucose (mM)	Pico da SPR (nm)	Tempo de formação das AuNPs (s)
1,25	575,00 ± 5,00	82,67 ± 1,70
1,5	572,00 ± 6,32	72,67 ± 1,25
2	565,00 ± 1,00	52,33 ± 1,25
3	562,50 ± 1,66	34,33 ± 1,70
5	555,00 ± 1,73	23,33 ± 0,47
7	551,00 ± 1,73	20,33 ± 0,47
10	547,50 ± 0,87	14,67 ± 0,47
12	546,50 ± 0,87	12,67 ± 0,47
15	544,50 ± 0,87	10,67 ± 0,47
20	541,00 ± 2,24	10,00 ± 0,82
30	538,00 ± 0,00	7,33 ± 0,47
50	535,50 ± 1,66	6,33 ± 0,47

## II – Diâmetros médios das AuNPs sintetizadas em solução para diferentes concentrações de glucose, obtidos por DLS

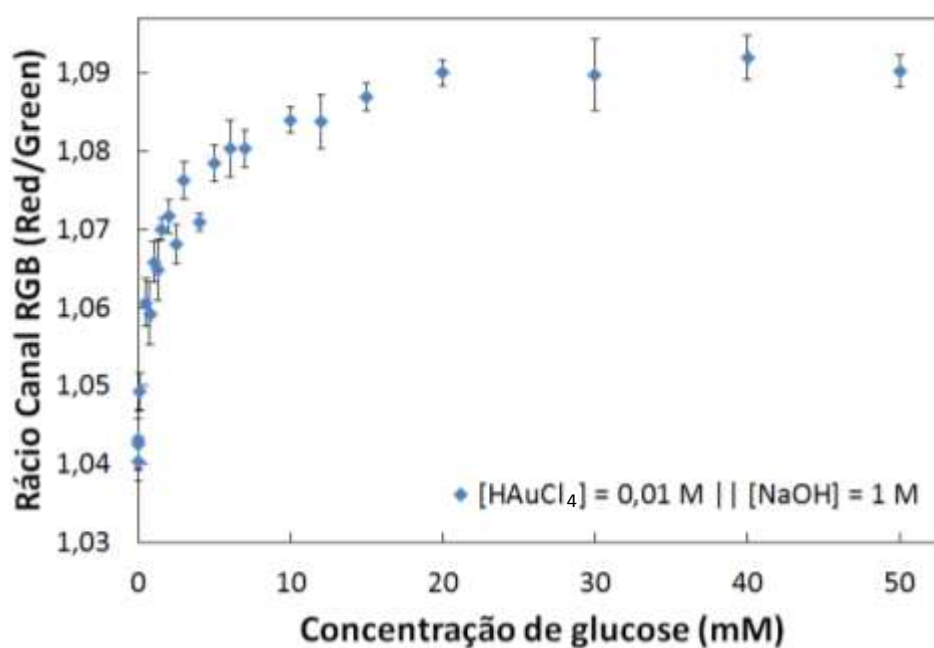
**Tabela 0.2:** Valores médios e desvios-padrão do diâmetro das AuNPs formadas em solução, para as diferentes concentrações de glucose testadas.

Concentração de glucose (mM)	Diâmetro médio das AuNPs (nm)
1,25	45,02 ± 31,69
1,5	35,75 ± 32,84
2	33,49 ± 34,95
3	31,78 ± 26,83
5	27,31 ± 25,48
7	26,80 ± 27,29
10	25,90 ± 20,93
12	23,44 ± 25,57
15	22,19 ± 13,50
20	20,56 ± 20,23
30	18,44 ± 21,64
50	14,65 ± 18,30

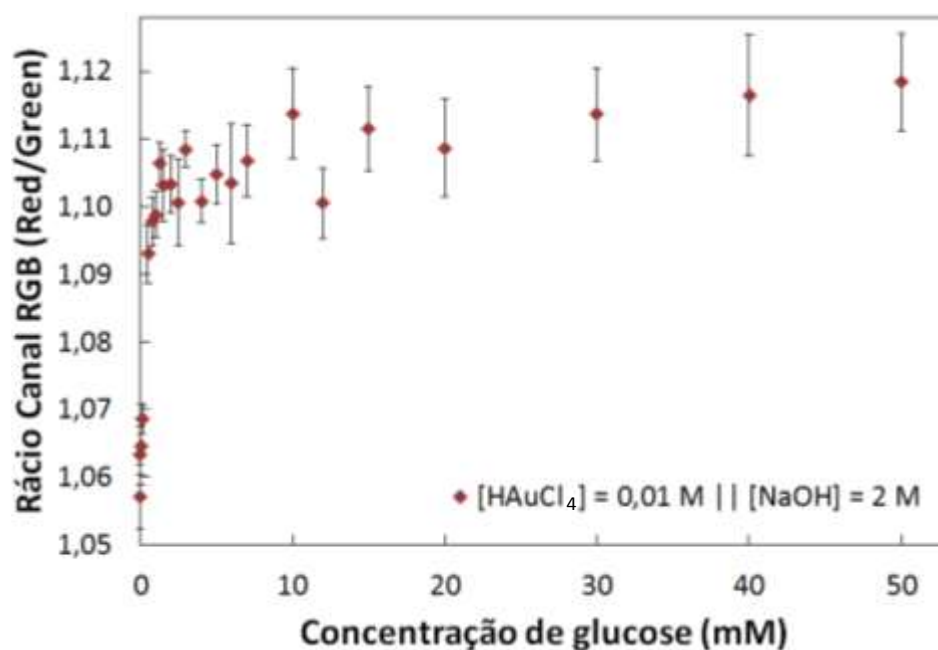
**III – Análise RGB para otimização das concentrações dos reagentes usados no processo de síntese de AuNPs em papel, utilizando microplacas de 24 poços em papel Whatman nº1**



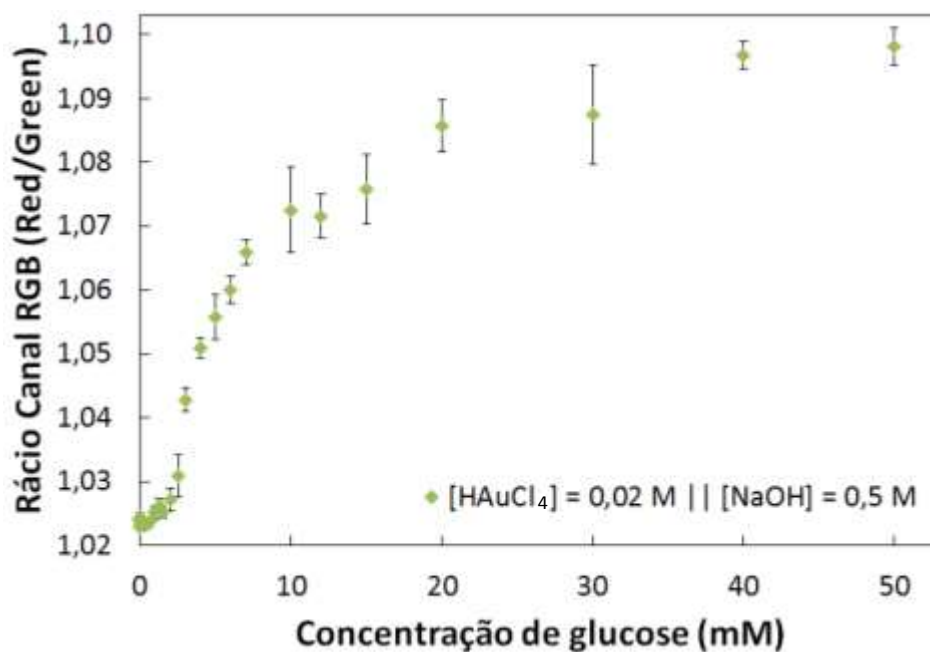
**Figura 0.1:** Análise RGB dos resultados colorimétricos obtidos nas zonas de teste da microplaca de papel, correspondentes a uma concentração de  $\text{HAuCl}_4$  de 0,01 M e a uma concentração de NaOH de 0,5 M.



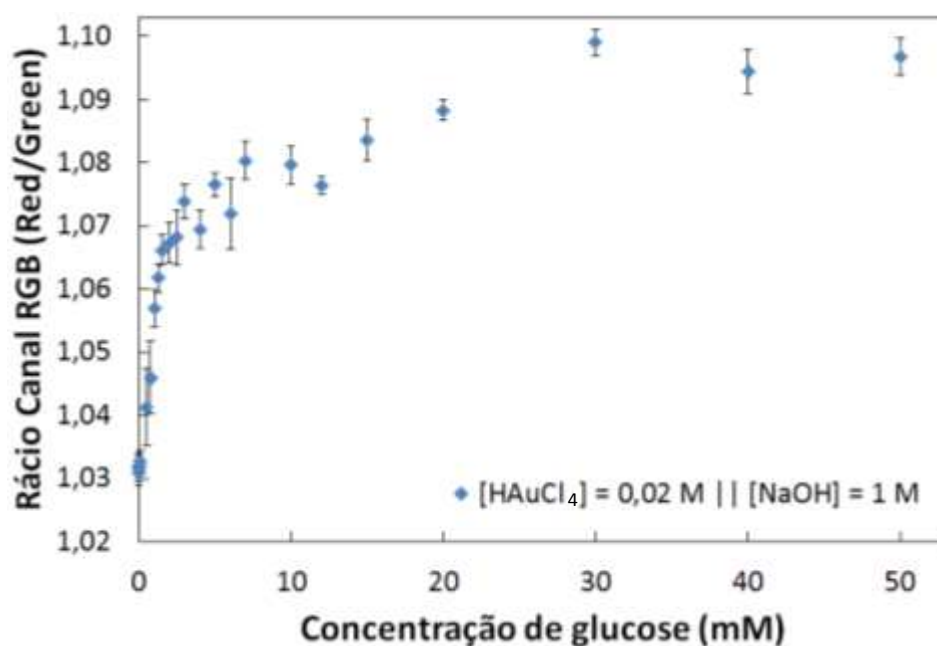
**Figura 0.2:** Análise RGB dos resultados colorimétricos obtidos nas zonas de teste da microplaca de papel, correspondentes a uma concentração de  $\text{HAuCl}_4$  de 0,01 M e a uma concentração de NaOH de 1 M.



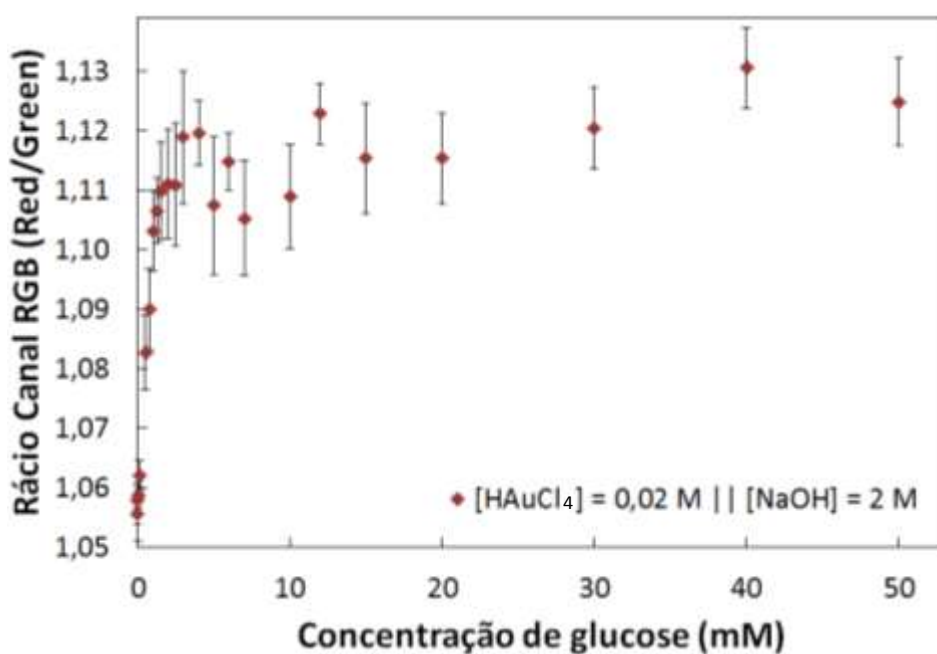
**Figura 0.3:** Análise RGB dos resultados colorimétricos obtidos nas zonas de teste da microplaca de papel, correspondentes a uma concentração de  $\text{HAuCl}_4$  de 0,01 M e a uma concentração de NaOH de 2 M.



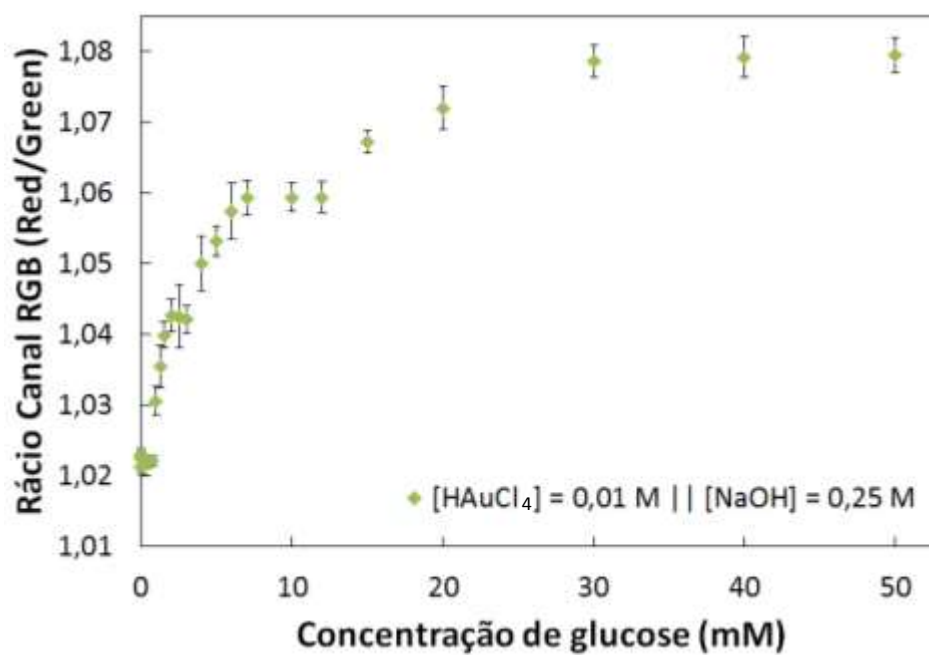
**Figura 0.4:** Análise RGB dos resultados colorimétricos obtidos nas zonas de teste da microplaca de papel, correspondentes a uma concentração de  $\text{HAuCl}_4$  de 0,02 M e a uma concentração de NaOH de 0,5 M.



**Figura 0.5:** Análise RGB dos resultados colorimétricos obtidos nas zonas de teste da microplaca de papel, correspondentes a uma concentração de  $HAuCl_4$  de 0,02 M e a uma concentração de NaOH de 1 M.



**Figura 0.6:** Análise RGB dos resultados colorimétricos obtidos nas zonas de teste da microplaca de papel, correspondentes a uma concentração de  $HAuCl_4$  de 0,02 M e a uma concentração de NaOH de 2 M.



**Figura 0.7:** Análise RGB dos resultados colorimétricos obtidos nas zonas de teste da microplaca de papel, correspondentes a uma concentração de  $HAuCl_4$  de 0,01 M e a uma concentração de NaOH de 0,25 M.